

Szerkezetváltozások és doménmozgások RecQ helikázokban

Kocsis Zsuzsa

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori iskola

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Prof. Nyitray László

Témavezető:

Dr. Kovács Mihály,

az MTA doktora, habilitált tudományos főmunkatárs



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

2014

„Humans! They lived in a world where the grass continued to be green and the sun rose every day and flowers regularly turned into fruit, and what impressed them? Weeping statues. And wine made out of water! A mere quantum-mechanistic tunnel effect, that'd happen anyway if you were prepared to wait zillions of years. As if the turning of sunlight into wine, by means of vines and grapes and time and enzymes, wasn't a thousand times more impressive and happened all the time . . .”

Terry Pratchett

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
I. Bevezetés-Irodalom.....	5
I/1. Helikázok.....	5
I/2. A DNS-hibajavítás útvonalai.....	6
I/3. RecQ helikázok működése a genom karbantartásban	9
I/4. RecQ helikázok szerkezete és mozgásai	9
I/5. Oligomerizáció	12
I/6. Trp fluoreszcencia, kinetikai tanulmányok	13
II. Vizsgált problémák és célkitűzések	15
III. Eredmények.....	17
III/1. Szerkezetváltozás az Ec RecQ DNS-kötésekor	17
Probléma felvetés.....	17
A stopped-flow módszer	18
A RecQ kétlépéses DNS-kötése	19
DNS hosszfüggés.....	20
A hőmérséklet hatása.....	23
Pirén excimer jelölés	23
Cisztein mutánsok előállítása	25
Pirén jelölés	27
Jelölt mutánsok aktivitásának megőrződése	31
A DNS hatása	33

Stopped-flow excimer jellel.....	34
III/2. Nukleotidok hatása a RecQ DNS-kötésére	37
III/3. RecQ helikáz doménjeinek hozzájárulása a DNS-kötés folyamatához	41
III/4. Nukleotid állapotok az ssDNS transzlokáció során	48
III/5. BLM helikáz oligomerizációja.....	50
IV. Eredmények értékelése.....	53
V. Anyagok és módszerek.....	56
Körülmények, anyagok és DNS-ek.....	56
Klónozás, fehérjetermelés.....	56
Pirén jelölés	57
Steady-state ATPáz mérések	57
Steady-state fluoreszcencia mérések.....	57
Stopped-flow mérések	58
Elektroforetikus mobilitás változási kísérletek (EMSA).....	58
Adatok elemzése	58
VI. Összefoglalás	60
VII. Summary	62
VIII. Ábrajegyzék	63
IX. Táblázatok jegyzéke	64
X. Rövidítések	65
XI. Értekezés alapjául szolgáló publikációk	67
XII. Egyéb publikációk.....	68
XIII. Irodalomjegyzék	70
XIV. Köszönetnyilvánítás.....	79

I. Bevezetés-Irodalom

I/1. Helikázok

A helikázok olyan P-hurok (ATP/GTP-kötő régiót tartalmazó) fehérjék, melyek nukleotid hidrolízisből származó energiájukat egy nukleinsav sín mentén való haladásra, illetve nukleinsav szálak szétválasztására fordítják.

A helikázok igen sokrétű aktivitással rendelkeznek: ezek közül az egyik a nukleotid hidrolízis, mely leggyakrabban ATPáz aktivitás, de lehet GTPáz (1) vagy dATPáz (2) aktivitás is. Továbbá a helikázok egy sín mentén végezhetnek nukleotid felhasználó aktív vagy passzív tovahaladó mozgást. A szálak szétválasztását is ugyanezen jellemző szerint csoportosíthatjuk: passzív szálszétválasztásról beszélhetünk, ha a helikáz az időnként statisztikusan felszakadó bázisok közti kötést nem engedi visszaalakulni, míg az aktív szálszétválasztásnál a helikáz torzítja a DNS szerkezetét, és ezért bomlanak fel a kötések (3). A nukleinsav duplexek lehetnek kettősszálú DNS (dsDNS), DNS-RNS heteroduplexek és kettősszálú RNS molekulák is (4). Bizonyos esetekben leírták, hogy egyes helikázok ellentétes, szálpárosító aktivitással is bírnak (5). Ezekből a működésekből további komplex aktivitások tevődnek össze, melyekről a továbbiakban szólok részletesen. Külön aktivitásnak tekinthető például a G-kvadruplexeknek nevezett szerkezetek szétbontása is (6). Ezek a nem Watson-Crick bázispárosodással létrejövő négyszálú szerkezetek például telomerekben fordulnak elő, és gátat képezhetnek a telomerek másolódása során a DNS megkettőződéskor.

Mindezen aktivitások alapja a DNS kötése, mely nélkül semmilyen működés, mely elősegítené az illegitim rekombinációk gátlását, a kétszálú DNS-törés javítását, a replikációs villák újraindítását, a genomkarbantartást nem lehetséges (7). Doktori munkámban a RecQ helikázok DNS kötésének karakterizálását, a kötés hatására végbemenő szerkezetváltozások megismerését tűztem ki célul.

1/2. A DNS-hibajavítás útvonalai

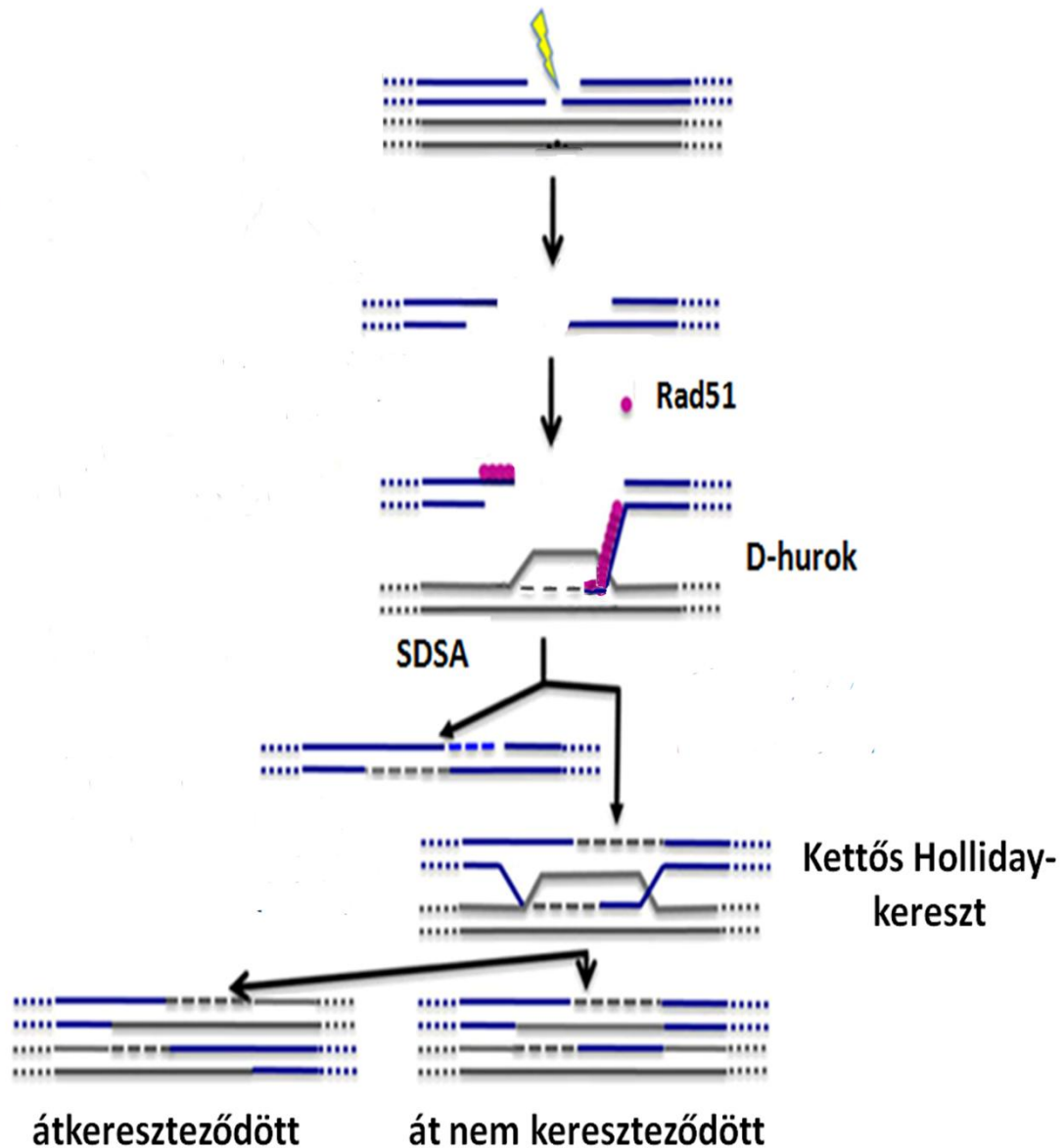
A RecQ helikáz család jelentőségének megértéséhez meg kell értenünk a DNS-hibajavítás szerepét a sejtes szervezetekben. Külső okok miatt (sugárzás, kémiai anyagok stb.), de a sejt természetes folyamatainak során is létrejönnek DNS-hibák. Az összes meghibásodás száma elérheti akár a megközelítőleg százezer DNS-hiba/nap/sejt értéket is. A genetikai információ minél pontosabb megőrzése és a kóros sejtfolyamatok megelőzése végett szükség van ezen hibák kijavítására. Ilyen kóros sejtfolyamatok ugyanis akár rákos tumor kialakulásához is vezethetnek (8). Számos, egymással részben párhuzamos DNS-hibajavítási útvonal létezik. Kisebb hibákat a kivágó mechanizmusok javítják: ilyenek a báziskivágó (Base Excision Repair) (9), a nukleotidkivágó (Nucleotide Excision Repair) (10) és az „össze nem illő párokat javító” (Mismatch Repair) (11) útvonalak. Ezen útvonalak mindegyikében kisebb-nagyobb darabok kivágása történik a DNS-ből (esetleg csak bázis kivágása), majd a komplementer szál mintául véve polimerázok kipótolják a rést, és ligáz enzimek összekötik a száldarabokat. A kétszálú DNS-törés olyan hiba, mely esetében nincs lehetőség a komplementer szál segítségül hívására, hiszen az is sérült. Pedig ez komoly probléma, hiszen a kétszálú DNS-törést a sejt például kromoszómavédként ismerheti fel, ami nagymértékű DNS átrendeződéshez, genetikai instabilitáshoz vagy apoptózishoz vezethet. A nem-homológ „végösszekapcsoló” javítás (NHEJ = Non-Homologous End Joining) és a homológ rekombináció (HR) alapú útvonalra ilyen esetekben van szükség (12). Az NHEJ összeköti a végeket anélkül, hogy próbálná pótolni az esetlegesen elveszett vagy módosuló információt – mégis még ez a lehetőség is előnyös a sejt számára az említett súlyos következmények elkerülése miatt (13). A homológ rekombináción alapuló javítás azonban akár mutáció-mentesen is képes a nagy problémát jelentő kettős száltörés javítására, ezért fontos az ebben a folyamatban szerepet játszó RecQ helikázok működése.

A HR alapú DNS-hibajavítás (**1. ábra**) kezdő lépéseként exonukleázok visszaemésztik az 5' DNS véget. A Rad51 fehérje (eukariótákban) beburkolja a hosszabb 3' DNS véggel rendelkező szálát nukleoprotein filamentumot képezve (**1. ábra** lila körök). Ez a szál „megkeresi” a homológ kromoszómán a komplementer régiót (különböző allélek esetén nem tökéletes az illeszkedés), és a nukleoprotein szál „betámad” homológ kromoszómapár szálaihoz, így alakítva ki a D-hurok (**1. ábra**) szerkezetet. A DNS-szálaknak szét kell válniuk, hogy a polimerázok elvégezhessék a másolást, és a D-hurok szerkezet vándorol a DNS-

szintézissel, ahogy a szálak a polimerázok előtt szétválnak. Amennyiben az első szál homológ kromoszómáról való kiegészülése után a D-hurok szerkezet szétbomlik, az első szál összekapcsolódik a másik törött véggel, és a másik eltörött szál javítása már ezt az újonnan szintetizálódott szálát használja templátként a szintézisfüggő szálpárosítási útvonalon (SDSA = Synthesis Dependent Strand Annealing; **1. ábra** bal oldal). Az is lehetséges, hogy a másik törött szál is a D-hurokba kapcsolódik, és kettős Holliday-kereszt jön létre (**1. ábra** jobb oldal). Ez a szerkezet is vándoroltatható, és két különböző módon feloldható. Nem átkereszteződött termékeket eredményez az egyik RecQ családba tartozó helikáz, a BLM helikáz és a Topoizomeráz III együttes működése. A rezolváz enzimek viszont random módon vágják el a kettős Holliday-keresztet, így átkereszteződött és át nem kereszteződött termékek véletlenszerűen keletkeznek.

A RecQ helikázok több helyen vesznek részt a HR alapú hibajavításban. Az előbb említett emberi BLM helikáz hozzájárulása ismert leginkább, így ezt fogom taglalni, bár *Escherichia coli*-ban (Ec) is hasonlóan működnek ezek az útvonalak. Először is a BLM helikáz segít az exonukleázok általi 3' túlnyúló szál létrehozásában (14). A Rad51 által létrehozott nukleoprotein szál elbontása a következő lehetséges beavatkozási pont (15)– ez csökkenti a rekombinációs események számát. A nukleoprotein szálak szétbontásakor főleg a transzlokációs (DNS-en tovahaladó) aktivitás játszik szerepet, de a Rad51 fehérjével való kölcsönhatás is szerepet játszhat (16). Ezután a D-hurok szétbontása következik, mely aktivitásnak például abban van szerepe, hogy csak a stabil, megfelelő mértékben homológ D-hurok szerkezetek maradjanak meg, így csökkentve az illegitim rekombinációk lehetőségét (17). A D-hurok és a kettős Holliday-szerkezet vándoroltatásakor a helikáz szálszétválasztó és szálpárosító aktivitására is szükség van. Az SDSA útvonal a D-hurok szétbontó aktivitást veszi igénybe az első szál kiegészítése után, míg a másik esetben a kettős Holliday-kereszt felbontása a Topoizomeráz III-mal együtt igényli a BLM helikázt (18). Összességében elmondható, hogy a RecQ helikázok csökkentik a rekombinációk számát, mert ezek potenciális veszélyt jelentenek a genom épségére, például azáltal, hogy egyes génszakaszok más környezetbe kerülve megváltoztathatják működésüket. Az összes rekombináció ellenható aktivitásokon túl a RecQ helikázok speciálisan csökkentik az illegitim rekombinációk hányadát. A megkülönböztetés például úgy lehetséges, hogy az illegitim rekombinációk esetén a homológ régió kisebb kiterjedésű, így a létrejövő D-hurok szerkezetek kevésbé

stabilak. A RecQ helikázok szintén beavatkoznak az útvonalak átkereszteződés-mentes termékek felé való irányításával a kettős Holliday-kereszt szétbontásakor (19).



1. ábra: A kétszálú DNS-törés homológ rekombinációs javítása: A kétszálú DNS-törés bekövetkezése és a 3' túlnyúló vég generálása után a Rad51 fehérje nukleoprotein filamentumot alakít ki. A filamentum beékelődik a homológ kromoszómapár homológ régiójában a két DNS-szál közé, D-hurkot képezve. A betámadó szálát polimerázok kiegészítik a homológ kromoszómapár alapján. A továbbiakban a másik hibás szál vagy az újonnan másolódott saját kromoszómához tartozó szárlól másolódik, vagy ez is a homológ DNS-ről másolódik, kettős Holliday-keresztet létrehozva. A kettős Holliday-kereszt feloldására az egyik lehetőség a helikáz és Topoizomeráz III együttműködéséből származó, át nem kereszteződött szerkezetek létrejötte, másrészt a rezolvázok általi elvágás, melynek átkereszteződött vagy át nem kereszteződött termékei is lehetnek (20).

I/3. RecQ helikázok működése a genom karbantartásban

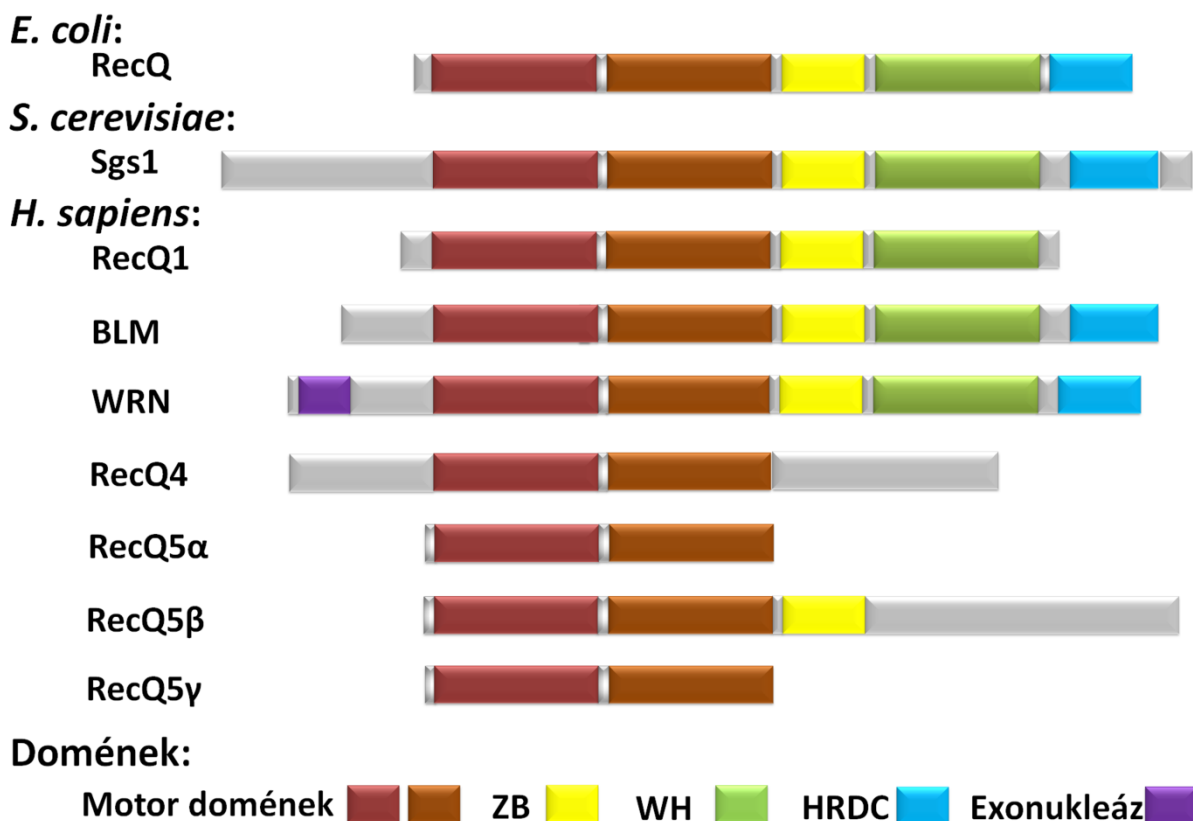
A RecQ helikáz család tagjai a baktériumoktól az emberig mindenhol megtalálhatóak. Az *Ec*-ban és *Saccharomyces cerevisiae*-ben a RecQ és az Sgs1 helikáz az egyetlen, emberben viszont öt családtag létezik: Recq1, BLM, WRN, Recq4 és Recq5. A Recq5-nek három splice-formája ismeretes: a Recq5 α , RecQ5 β , RecQ5 γ .

A RecQ helikázoknak a genom karbantartásában és a HR alapú DNS-hibajavításban van szerepük (17,21-25), ezt jól mutatja, hogy a humán helikázok meghibásodásai súlyos betegségeket okoznak. A BLM helikáz hibája Bloom-, a WRN helikázé Werner-, a Recq4-é Rothmund-Thomson- szindrómához vezet (26). Ezek a betegségek genom instabilitással és erős rákra való hajlammal járnak. A prototipikus RecQ a HR alapú DNS-hibajavításban (27,28) és a megtorpant replikációs villák újraindításában is szerepet játszik (29,30).

I/4. RecQ helikázok szerkezete és mozgásai

A RecQ helikázok a helikázok SF2 szupercsaládjába tartoznak. Két RecA-típusú domén alkotja a magjukat (**2. ábra**): ezeknek az ATP-kötésben, hidrolízisben, az egyszálú (ss) DNS kötésében, az energia mozgássá való átalakításában van szerepe. A RecA domének 7 konzervált helikáz motívumot tartalmaznak. A magdoménekhez a C-terminális felől kapcsolódik a Zn²⁺-kötő (ZB) domén (Zn²⁺-binding domain), amelynek a szerkezet stabilizálása mellett egyes RecQ fehérjék DNS-kötésében is szerepe lehet. Ezenkívül a RecQ helikázok rendelkeznek egy szárnyas hélix doménnel (Winged-helix = WH), ami a hélix-hurok-hélix motívumok családjához tartozik. E hélix-hurok-hélix család egyes tagjai azonban eredeti nukleinsav-kötő funkciójuk mellett fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is töltenek be szerepet, illetve stabilizálhatják a fehérje szerkezetét (31). A legtöbb RecQ fehérjében megtalálható továbbá a HRDC domén (Helicase-RNaseD-C-terminal), mely segít a komplex DNS szerkezetek feldolgozásában RecQ és BLM helikázok esetében (32,33). Bizonyos további domének is előfordulhatnak a RecQ helikázokban: ilyen például a WRN-re jellemző exonukleáz domén, melynek funkciója még nem teljesen tisztázott. E domén a DNS-végek

visszaemésztését végezheti a NHEJ javításnál, és kapcsolatban állhat a Werner-szindrómás betegek felgyorsult öregedésével (34-36). A RecQ helikázoknak a sejtmagba való bejutáshoz esetenként szükségük van NLS szignálra (Nuclear Localisation Signal) is.



2. ábra: A RecQ helikázok konzervált doménszerkezete: Baktériumtól az emberig a RecQ helikázok sokféle élőlényben előfordulnak, doménszerkezetük is konzervált. A két RecA domén alkotja a motor magját, mely az ATPáz aktivitásért felel (pirosak). A ZB (sárga) szerkezetstabilizáló szerepet tölthet be, a WH (zöld) és HRDC (kék) doméneknek DNS-kötő szerepet tulajdonítanak. A WRN helikáz még további exonukleáz doménnel is rendelkezik. A Recq5 helikáz különböző izoformáiban sem azonos a doménszerkezet. (A doméneket jelölő dobozok hossza nem tökéletesen arányos a domének aminosavszámával.)

A RecQ helikázok DNS-kötő helye pontosan nem ismert, de feltételezhető, hogy több DNS-kötő régió van a molekulán belül, és valószínűsíthető, hogy vannak köztük ssDNS- és dsDNS-kötő régiók is. A RecA domének mellett a ZB domén az egyik hely, melynek a szerkezetet stabilizáló szerepe mellett DNS-kötő szerepet is tulajdonítanak (37). Továbbá a WH domén DNS-sel létesített kölcsönhatása a szálszétválaszáshoz tűnik szükségesnek (38-40). Hasonlóan DNS-kötő a HRDC domén is, melyet nem sikerült még együtt kristályosítani a

molekula többi részével. Ez valószínűleg a mozgékony összeköttetésüknek tudható be, de a HRDC domén térszerkezete külön, bizonyos esetekben ismert (41-43). Ez a domén a humán BLM és Ec RecQ esetében szükséges a bonyolultabb DNS-szerkezetek feldolgozásához (32,44).

Pike és munkatársai a Recq1 fehérje DNS-sel kristályosított, azonban DNS-mentes kristályszerkezetét más helikázok DNS-kötött kristályszerkezetéhez illesztve egy DNS-kötött Recq1 szerkezetet generáltak, mely azonban nem különbözött jelentősen a DNS-mentes állapottól (45,46). Azonban a RecQ kristályszerkezetével (33) összehasonlítva észlelhető, hogy a WH domén máshogy helyezkedik el a két szerkezetben.

Mint azt már több munkában megállapították, a RecQ helikázokban az ATP hidrolízis energiája hajtja a DNS-szerkezetének megváltoztatását (47-49), így szükségszerűen kell lennie kommunikációnak az ATP és DNS-kötőhely között, amiről viszont igen keveset tudunk. A BLM helikáz esetében csoportunk megállapította, hogy az ATP-kötést szignifikánsan nem befolyásolja az ssDNS jelenléte (50). Továbbá ismert, hogy az Ec RecQ helikáznál az AMPPNP csak igen kis hatást gyakorolt az ssDNS affinitásra (51). A 2. és 3. helikáz-motívum közt elhelyezkedő, aromás aminosavakban gazdag régiónak jelentőséget tulajdonítanak a nukleinsav-kötés, szálszétválasztás és az ATP hidrolízis csatolásában (52). Ezenkívül kimutatták, hogy az ún. arginin-ujj a BLM helikáz 4. helikáz motívumában a γ -foszfátnál kapcsolódva az ATP-hez, összekapcsolja a DNS-kötést és az ATP hidrolízist a szálszétválasztó aktivitással (53). Az Ec RecQ-ban csak doménen belüli flexibilitás-változásokat mutattak ki molekuláris dinamikai szimulációkkal DNS-kötés hatására (54).

Általában a helikázok DNS-kötése által előidézett konformáció-változásról is hiányosak az ismeretek (23). A kommunikációval járó konformációs mozgások vizsgálatára alkalmasak egyrészt a biokémiai mérések, másrészt pedig a DNS-kötött és mentes állapotban megoldott kristályszerkezetek összehasonlítása. Biokémiai módszerekkel a Rep, UvrD (SF1) (55), a PriA (SF2) (56) és DnaB (SF6) (57,58) fehérjékről mutatták ki, hogy konformáció változáson esnek át DNS kötődésekor. Kinetikailag a PriA és DnaB fehérjéket vizsgálták fluoreszcens DNS-származékok segítségével, és mindkét esetben megállapították, hogy a DNS-kötést egy második, izomerizációs lépés kíséri (59,60).

A két kötőhely kommunikációját tekintve ismert, hogy a DNS-sel való kölcsönhatás a PcrA (SF1) (61) és a RecD2 (SF1) (62) esetében befolyásolta az ATP hidrolízishez kötődő

konformációs változást. A DNS-kötő hely és a nukleotid zseb közti kommunikációt szintén biokémiai módszerekkel vizsgálták a PriA (SF2) (56) és DnaB helikázok esetében (58).

Kristályszerkezetek összehasonlításával kimutatták, hogy az Ec UvrD (SF1) 2B doménje (amely a HRDC doménhez hasonlít) jelentős elforduláson esik át ssDNS-kötéskor (63,64).

Ismert tehát, hogy a RecQ helikázok in vitro rendkívül változatos DNS-alapú transzlokációs és szerkezetátalakító aktivitásokat végeznek, amelyek a homológ rekombinációs DNS-hibajavítás és a replikációs villa újraindítás során elengedhetetlenek. Ezenkívül ismert a RecQ helikázok konzervált doménszerkezete, azonban a RecQ helikázok működése során lejátszódó szerkezetváltozások nem ismertek. Az Ec RecQ ill. humán RECQ1 fehérjék szerkezete eltérő konformációkban került meghatározásra, azonban egyazon homológ esetében nem ismertek különböző konformációk. Azaz nem ismert, hogy a különböző RecQ helikáz homológok eltérő szerkezetei az enzimciklus különböző állapotait képviselik, vagy az eltérések izoforma-specifikusak.

A RecQ helikázok DNS-kötőhelye illetve DNS-kötött szerkezete nem ismert. Adatok vannak arra vonatkozóan, hogy több domén is hozzájárul a DNS-kötéshez, azonban ezek változásai a ciklus során ismeretlenek.

1/5. Oligomerizáció

A RecQ helikázok szerkezetével kapcsolatban gyakran felmerül az oligomerizáció kérdése, mely szoros kapcsolatban áll az dolgozatomban tárgyalt DNS-kötés fehérjeszerkezet kapcsolatát tárgyaló témakörrel. A helikáz szupercsaládok közül az SF1 és SF2 szupercsaládokban két RecA domén található: ilyen módon a kettő közti kötőhelyen végbemehet az ATP hidrolízis a monomer enzimben is, de komplexebb működésekhez szükség lehet az oligomerizációra. Azonban a további szupercsaládok (SF3-6) – mivel csak egy RecA, vagy AAA⁺ domént tartalmaznak – erre nem alkalmasak, ott feltétlenül szükség van oligomerizációra. Régóta vitatott, hogy az SF2 szupercsaládba tartozó RecQ helikázok oligomerizálódnak-e. A BLM helikáz kimutatottan képes monomerként ATPáz aktivitás-függő működésekre (65,66). Gélszűrési és alacsony felbontású elektronmikroszkópiás (EM) kísérletek alapján azonban feltételezik a DNS-mentes BLM oligomerizációját (67). Egyes DNS

széttekerési kísérletek a legnagyobb hatékonyságot 1:1 szubsztrát/BLM mólarányánál mutatták, így feltételezhető, hogy ilyenkor monomerként működik a BLM, de a szálvándoroltatási aktivitás maximumának eléréséhez nagyobb arány szükséges (68). A dsDNS szubsztrátokat a BLM monomerként is képes széttekerni (69). A BLM N-terminálisáról (1-431 aminosav régió) kimutatták, hogy hexa- és dodekamereket képez, ami arra utal, hogy ez a régió felelős az oligomerizációért (70). Szintén bizonyított, hogy a rövidített, ezt a részt is nélkülöző BLM (642-1290 aminosav régió) monomerként is képes elvégezni aktivitásainak többségét (65,66).

Más RecQ helikázok esetében is találtak oligomerizációra mutató bizonyítékokat (68,71-73), így elképzelhető, hogy a HR különböző lépéseinek katalízisét, más és más aktivitásokat más és más oligomer formában végzik az egyes RecQ helikázok.

A Ec RecQ helikáz egyes kísérletek szerint monomerként köt a DNS-hez (74,75), viszont más mérések a széttekerési aktivitás oligomerként való végrehajtását sugallják (76,77).

A RecQ helikázoknak tehát egy újabb szerkezeti tulajdonsága, az oligomerizáció függhet a DNS-kötéstől, mivel indikációk léteznek, hogy különböző működéseket ezen fehérjék más-más oligomer formában láthatnak el. Amennyiben a DNS befolyásolja az oligomerizációt, a DNS szerkezete – ami nagyon fontos a homológ rekombinációs javításkor a szubsztrátok felismerésében – vajon befolyásolja-e az oligomerizációs állapotot? Kérdés továbbá, hogy a RecQ helikázok mely aktivitásai milyen oligomerizációs állapotban mennek végbe, és van-e együttműködés a monomerek között a DNS-kötésben és az ATP hidrolízisben.

I/6. Trp fluoreszcencia, kinetikai tanulmányok

A triptofán (Trp) fluoreszcencia gyakran felhasznált jel a fehérje-nukleinsav-kötési munkákban, ssDNS-kötő fehérjéknél (T4 gene 32 protein, SSB) és a RecA fehérje esetében, hogy csak pár fontos példát említsünk(78-80). A DnaB helikáz esetében a nukleotid és DNS-kötés csökkentette a Trp fluoreszcenciát, és különböző ligandum-kötött konformációkat lehetett kimutatni (81). A Rep helikáz esetében pedig mind a Trp fluoreszcenciával, mind

fluoreszcens DNS-sel végzett mérések alapján kétlépéses DNS-kötést lehetett kimutatni, mely a Rep dimerizációját is magában foglalta (82,83).

Az Ec RecQ fehérje négy Trp-t tartalmaz: kettőt az N-terminális felőli RecA doménben (Trp¹³⁸, Trp¹⁵⁴), egyet a ZB (Trp³⁴⁷) és egyet a WH (Trp⁴⁶⁹) doménben (**13. ábra**). Munkám egy részében ezeket a Trp jeleket használtam fel a RecQ DNS-kötésének és konformációjának követésére, így a teljes fehérjére vonatkozó információhoz juthattam.

II. Vizsgált problémák és célkitűzések

1. A RecQ és a DNS-kötött Recq1 fehérje kristályszerkezete konzervált voltuk ellenére jelentősen különbözik, ami származhat a RecQ homológok különbségéből, vagy a DNS-kötés közben végbemenő izomerizációtól.
Meg kívántuk vizsgálni, hogy okoz-e a DNS-kötés szerkezetváltozást az Ec RecQ helikázban.
2. A RecQ helikázokban több DNS-kötőhely van, de nem ismert, hogy együttműködésüket, a kötés erősségét, az esetleges szerkezetváltozást hogyan befolyásolja a helikáz enzimciklusa (nukleotid állapota).
Elemezni akartuk, hogy az esetleges szerkezetváltozást (illetve a DNS-kölcsönhatás erősségét) hogyan befolyásolja a RecQ enzimnek az ATPáz ciklus során ciklikusan változó enzimátikus (nukleotid-) állapota.
3. A RecQ helikázok doménszerkezetében számos konzervált felépítési elv található, de felderítetlen a különböző domének szerepe a DNS-kötésben.
Célunk volt meghatározni a RecQ helikáz doménjeinek hozzájárulását a DNS-kötési folyamatokhoz.
4. Ismertek a RecQ helikáz steady-state transzlokációjának tulajdonságai, de nem tisztázott, hogy mely nukleotid állapotok milyen mértékben járulnak hozzá a transzlokáció folyamatához, ami a DNS-szerkezetátalakító aktivitások alapja.
Fel kívántuk deríteni, hogy mely nukleotid állapotok (illetve DNS-kötött szerkezetek) fordulnak elő a legnagyobb arányban a steady-state ssDNS transzlokáció során.
5. Egyes kísérletek szerint a RecQ helikázok különböző aktivitásaikat különböző oligomerizációs állapotban végezhetik, ám ez nagyrészt felderítetlen, és régóta vita tárgyát képezi.

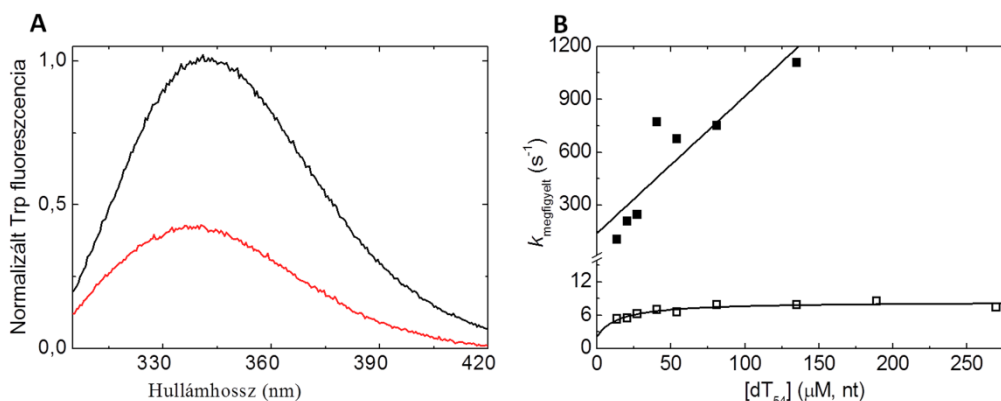
Célkitűzéseink közt szerepelt a BLM helikáz oligomerizációs állapotának vizsgálata DNS-kötéskor, a DNS-szerkezet hatásának megismerése erre a folyamatra. Ezenkívül vizsgálni kívántuk a BLM egyes aktivitásának oligomerizációs állapot szempontjából. Választ kívántunk adni arra a kérdésre, hogy van-e együttműködés a BLM monomerek között a DNS-kötésben és az ATP-hidrolízisben.

III. Eredmények

III/1. Szerkezetváltozás az *Ec* RecQ DNS-kötésekor

Probléma felvetés

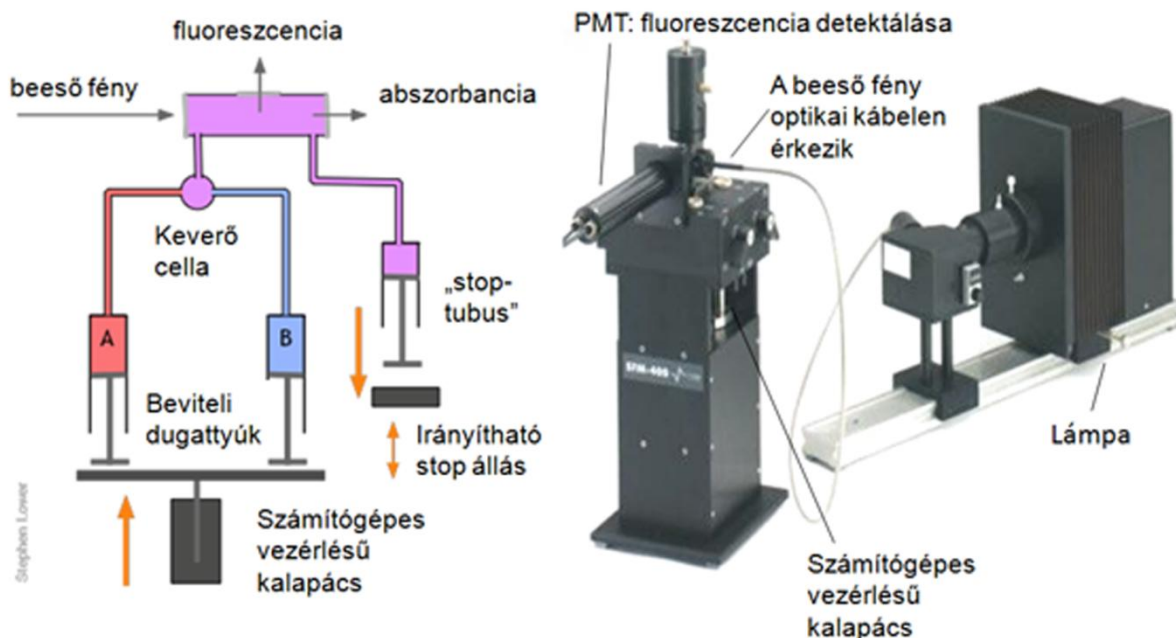
Annak vizsgálatára, hogy DNS-kötés hatására megy-e végbe szerkezeti változás az *Ec* RecQ helikázban, csoportunkból Sarlós Kata Trp fluoreszcencia méréseket végzett, steady state körülmények között. A RecQ Trp fluoreszcencia emissziós spektrumának vizsgálata megmutatta, hogy a Trp fluoreszcencia érzékeny az ssDNS-kötésre (**3.A ábra, 5. táblázat**). A reakció további jellemzésére, a csökkenés okainak kimutatására stopped-flow módszert használtunk.



3. ábra: A RecQ helikáz DNS-kötése steady-state és gyorskinetikai módszerekkel vizsgálva: **A**, RecQ helikáz (3 μ M) steady-state Trp fluoreszcencia emissziós spektrumai dT_{54} (162 μ M, nt) jelenlétében (piros) illetve hiányában (fekete). **B**, RecQ helikáz stopped-flow mérésekben megállapított megfigyelt sebességi állandói DNS koncentráció függvényében (az első fázis teli, második üres szimbólumokkal jelölve). A gyorsabb fázis (K_1) adataira egyenest illesztettünk, melynek meredeksége az átalakulás (k_1), y-tengelymetszete pedig a visszaalakulás sebességi állandóját (k_{-1}) adja meg. A lassabb fázis (K_2) pontjaira hiperbolát illesztettünk, ennek y-tengelymetszetéből a visszaalakulás sebessége (k_{-2}), asszimptotájából az oda és visszaalakulás sebességi állandóinak összege (k_2+k_{-2}) számolható. Ezek a mérések 25 °C-on történtek. A számolt adatok és állandók az **5. táblázatban** találhatóak.

A stopped-flow módszer

Reakciók kinetikai jellemzésére különösen alkalmasak a stopped-flow mérések, mivel ez a technika lehetőséget ad a reakciók időbeli követésére igen kis holtidővel (akár 1 ms). Olyan információkhoz juthatunk a steady-state állapot előtt történetekről, amik más módszerekkel nem elérhetőek. Ezekben a készülékekben rendkívül gyorsan történik meg a mintatartókba bevitt kiindulási anyagok keverése egy speciális keverővel, majd a keverék beáramlik a küvettába, kimosva az előző mérésből maradt oldatot (vagy a mosáskor használt puffert). A monokromatizált gerjesztő fény optikai kábelen jut a küvettába, a detektálás pedig fluoreszcencia mérés esetén ehhez képest derékszögben fotoelektronsokszorozóval (PMT) történik. A jel lehet fluoreszcencián kívül abszorbancia és fényszórás is, használható akár két PMT is párhuzamos detektálásra. A kimenő fény mérésénél optikai szűrőket alkalmazunk. A Trp fluoreszcencia a molekuláris környezetre igen érzékeny jel, amely azonban nem igényel beavatkozást a fehérjeszekvenciába. Az excimer pirén jel pedig specifikussága miatt jár kiemelkedő előnyökkel.



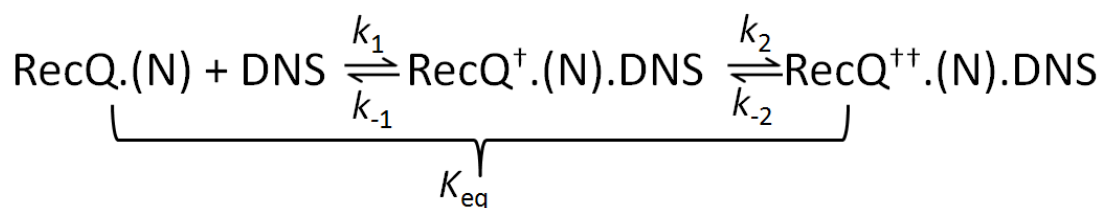
4. ábra: Stopped-flow készülék és működése: A stopped-flow készülék működésének lényege, hogy a kiindulási oldatokat olyan gyorsan keverjük össze, hogy gyors reakciók is megfigyelhetővé válnak (a kísérleteimben használt BioLogic stopped-flow holtideje 1 ms). A számítógép által vezérelt kalapács a dugattyúból a folyadékokat egy speciális keverőbe juttatja, majd onnan a keverék a küvettába kerül. A küvettában történő eseményeket optikai

módszerrel követhetjük, esetünkben a fluoreszcencia jel fotoelektronsokszorozó (PMT) által felnagyítva és digitalizálva válik kiértékelhetővé (84).

A RecQ kétlépéses DNS-kötése

A RecQ.nukleotid komplexek és az ssDNS reakciója közben tapasztalható nagymértékű fluoreszcencia csökkenést stopped-flow rendszerben vizsgáltuk (**3.B ábra**). A RecQ-DNS kötési görbéket ekkor még Sarlós Kata kétfázisúként értékelte ki, később az 5 °C-on általam végzett mérésekkor sikerült elkülöníteni egy harmadik fázist. Az utolsó fázis azonban megtalálható volt a DNS-mentes kontroll mérésekben is, így a fotokioltság (photobleaching) jelenségének tudtuk be. Azonban az így újraértékelt adatok kismértékben módosították a számolt adatokat, így a publikált és itt közölt eredményeink kismértékben különböznek Sarlós Kata doktori disszertációjában táblázatban foglalt adatoktól, a tendenciák azonban azonosak.

Az alapján, hogy a DNS-kötés első fázisának megfigyelt egyensúlyi állandói függtek a DNS koncentrációtól, míg a második fáziséi nem, megállapítható volt, hogy az első, gyorsabb kötési fázist egy második izomerizációs lépés követi (**3.B ábra**). Ennek alapján felállítottuk a következő reakció modellt (**1. séma**), melynek jelöléseit a reakciók kinetikai állandóinak megnevezésére a továbbiakban használni fogom. Az első lépés tehát k_1 és k_{-1} kötési és disszociációs sebességi állandójú, K_1 disszociációs egyensúlyi állandóval jellemezhető másodrendű, kötési reakció. A második lépés pedig a RecQ fehérje, a nukleotid (N) és az ssDNS komplexének k_2 és k_{-2} sebességi állandókkal, és K_2 jobb irányú egyensúlyi állandóval leírható elsőrendű, izomerizációs lépése. A reakció egészét K_{eq} -t szintén disszociációs állandóként írjuk le: $K_{eq} = ([RecQ.(N)]_{eq} * [DNS]_{eq}) / ([RecQ^+. (N.)DNS]_{eq} + [RecQ^{++}. (N.)DNS]_{eq})$



1. séma: A RecQ kétlépéses DNS-kötése: A RecQ fehérje köti a DNS-t egy másodrendű folyamat során, majd a létrejött komplex egy elsőrendű folyamat során konformációs változáson megy át. A folyamat mindkét lépése Trp fluoreszcencia csökkenéssel jár ($^+$ -vel és $^{++}$ -vel jelölve). A k_1 és k_{-1} sebességi állandók a kötési fázis, k_2 , k_{-2} sebességi állandók a konformációváltozási lépés oda és visszaalakulási állandói. N a RecQ által kötött nukleotid vagy nukleotid analóg, de lehetséges a RecQ nukleotid-mentes állapota is.

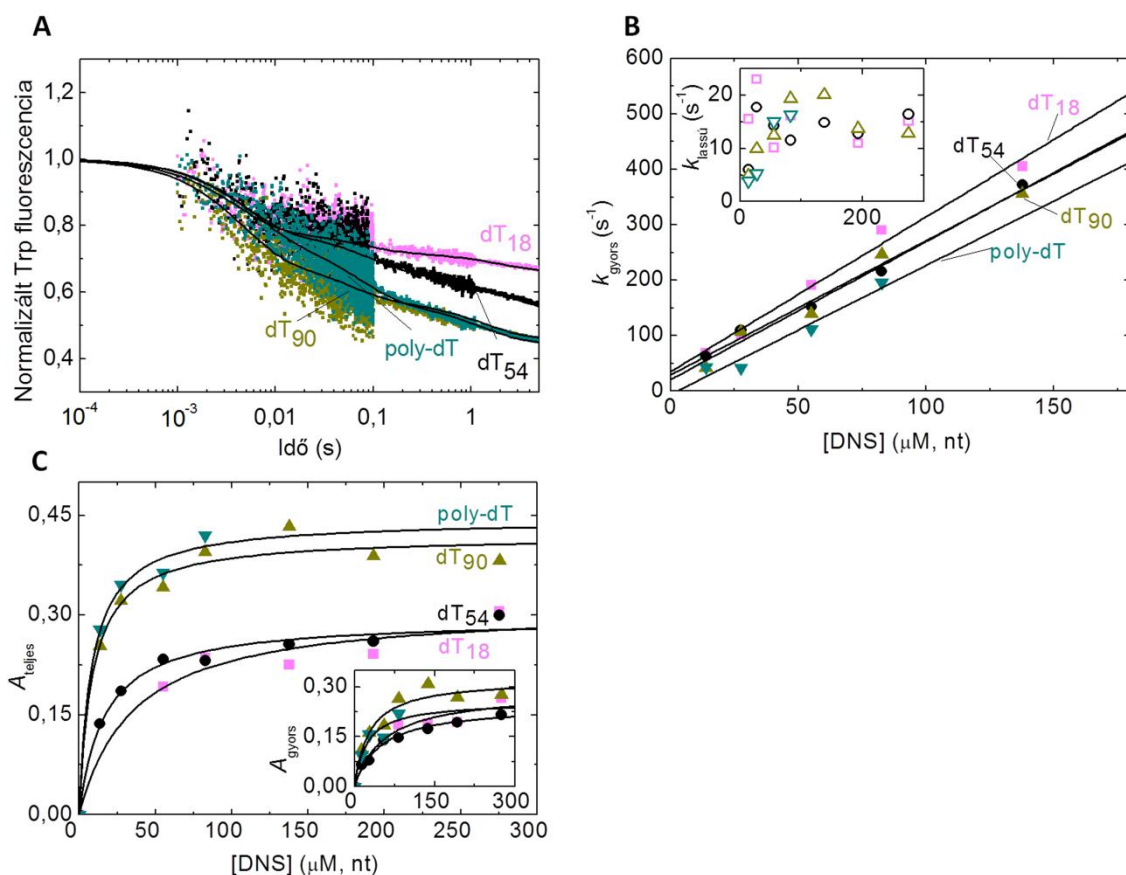
DNS hosszfüggés

A könnyebb kiértékelés és az amplitúdóvesztés megakadályozása érdekében a továbbiakban, a saját méréseim során csökkentettem a hőmérsékletet 5 °C-ra. Ilyen körülmények között lehetővé vált az egyensúlyi kötési állandók precízebb meghatározása is. Az előzőekben elvégzett kísérletekhez hasonlóan stopped-flow készülékben „pillanatszerűen” kevertük össze RecQ fehérjét és különböző hosszúságú DNS-eket tartalmazó oldatokat (dT₁₈, dT₅₄, dT₉₀, poly-dT) (5. ábra). A mérőberendezés lehetőséget nyújt különböző gyakoriságú mintavételezésre, ami biztosíthatja, hogy illesztéskor, az illesztési paraméterek kiszámításánál egyelő mértékben essenek latba. Kvázi-logaritmikus illetve osztott lineáris skálát alkalmaztunk, ami a rövidebb integrációs idők miatt kisebb jel/zaj arányt eredményez az időskála kezdeti szakaszán. A DNS koncentrációk a dolgozatban mindenhol nukleotid koncentrációban lesznek megadva.

Minden DNS hosszúság esetén változatlanul háromfázisú görbéket kaptunk, ahol a harmadik fázist a fotokioltság jelenségének tudtuk be. A többszörös exponenciális illesztésekből kapott megfigyelt gyors sebességi állandókat (k_{gyors}) DNS koncentráció függvényében ábráztuk, egyeneseket illesztettünk és ezek y tengelymetszetéből adódott a k_{-1} illetve meredekségéből a k_1 . A lassú fázis maximális értékeiből következtethettünk ($k_2 + k_{-2}$)-re (1. táblázat).

Az első fázis egyensúlyi állandója (K_1) nem változott szignifikánsan a DNS hossz növekedésének hatására, de k_{-1} lassabbnak, a kötés erősebbnek tűnt a poly-dT esetében. A

DNS hossz nem befolyásolta a k_1 és k_2 sebességi állandókat, azonban a második, izomerizációs lépés hozzájárulása növekedni látszik a hossz növekedésével. Ez annak ellenére elmondható, hogy a $k_{-2} + k_2$ nem változik szignifikánsan. Szintén megfigyelhető az összesített DNS affinitás (K_{eq}) hosszfüggő növekedése.



5. ábra: A RecQ DNS-kötésének DNS hosszfüggése: **A**, RecQ (0,5 μM) Trp fluoreszcencia stopped-flow görbék különböző hosszúságú DNS-ekkel: dT₁₈ (rózsaszín), dT₅₄ (fekete), dT₉₀ (sötét arany), poly-dT (sötét cián), mindet 81 μM, nt koncentrációban alkalmazva. Háromfázisú exponenciális görbe illesztések látszanak fekete vonallal, (a harmadik fázis a fotokioltság). A görbék a DNS-mentes állapotra normalizáltak. **B**, A megfigyelt sebességi állandók a DNS koncentráció függvényében, a gyors fázisé a fő panelben, a lassú fázisé a mellékpanelben. (dT₁₈ négyzettel, dT₅₄ körrel, dT₉₀ álló háromszöggel, poly-dT fordított háromszöggel jelölve, színek az **A** ábrához hasonlóan) Az egyenes illesztések fekete vonallal jelölve láthatók. **C**, Különböző hosszúságú DNS-ek (jelölések, mint **B** ábrán) stopped-flow görbéinek amplitúdója a DNS koncentráció függvényében (fő panelben a teljes, mellékpanelben a gyors fázisé), és az illesztett hiperbolák. A méréseket 5 °C-n végeztem, a számolt adatok a **1. táblázatban** találhatóak.

1. táblázat: A RecQ kötési tulajdonságok függése a DNS hosszától ^a

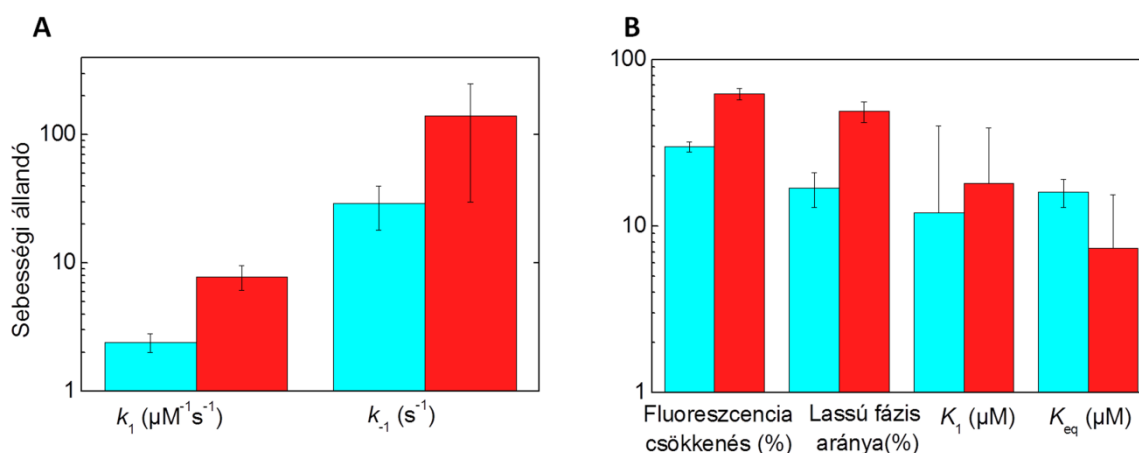
Paraméterek	Meghatározás módja	dT ₁₈	dT ₅₄	dT ₉₀	poly-dT
Teljes DNS- indukált fluoreszcencia csökkenés (% a DNS-mentes állapothoz viszonyítva)	Amplitúdók	31 ± 2	30 ± 2	42 ± 2	44 ± 2
A lassú fázis hozzájárulása (a teljes csökkenés %-ban)	Amplitúdók	9 ± 4	17 ± 4	23 ± 4	43 ± 5
k_1 ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Kötési kinetika	2,8 ± 0,4	2,4 ± 0,4	2,5 ± 0,2	2,3 ± 0,7
k_{-1} (s^{-1})	Kötési kinetika	35 ± 14	29 ± 11	21 ± 16	< 10
K_1 (μM)	k_{-1}/k_1	13 ± 7	12 ± 7	8,4 ± 7,1	13 ± 7
	Amplitúdók	55 ± 27	49 ± 8	27 ± 8	23 ± 14
$k_2 + k_{-2}$ (s^{-1})	Kötési kinetika	15 ± 3	16 ± 4	17 ± 16	> 20
K_{eq} (μM)	Amplitúdók	36 ± 16	16 ± 3 ^b	9,0 ± 2,0 ^b	8,0 ± 2,0 ^b

^a 5°C, dT₅₄, RecQ (0,5 μM) stopped-flow Trp fluoreszcencia adatok. A paraméterek elnevezése az **1. sémára** utal. Minden mértékegységgel jelölt paraméter a koncentrációkat is beleértve az nt-ben megadott DNS koncentrációkból adódik.

^b A látszólagos K_{eq} értéket a RecQ koncentráció és DNS-kötés sztöchiometriája limitálja (**3. táblázat**), így K_{eq} felső határát képviseli.

A hőmérséklet hatása

Mivel a már meglévő mérések között a nukleotid-mentes állapot, és az én méréseim, amiket dT₅₄-el végeztem ugyanazt az állapotot jelentik 5 és 25 °C-on (**1. és 5. táblázat**), így a mérések összehasonlíthatóak. Megállapítható, hogy a Trp fluoreszcencia csökkenés kisebb az alacsonyabb hőmérsékleten. Ennek oka lehet, hogy az izomerizációból származó hozzájárulás kisebb (**6. ábra**). Az első disszociációs konstans (K_1) ugyanis változatlan, hiszen bár k_{-1} , k_1 is csökkent a hőmérséklet csökkenésével, ezek mértéke azonos. Az összegzett affinitás kisebb 5 °C-on, ami endoterm DNS-kötési reakcióra utal.



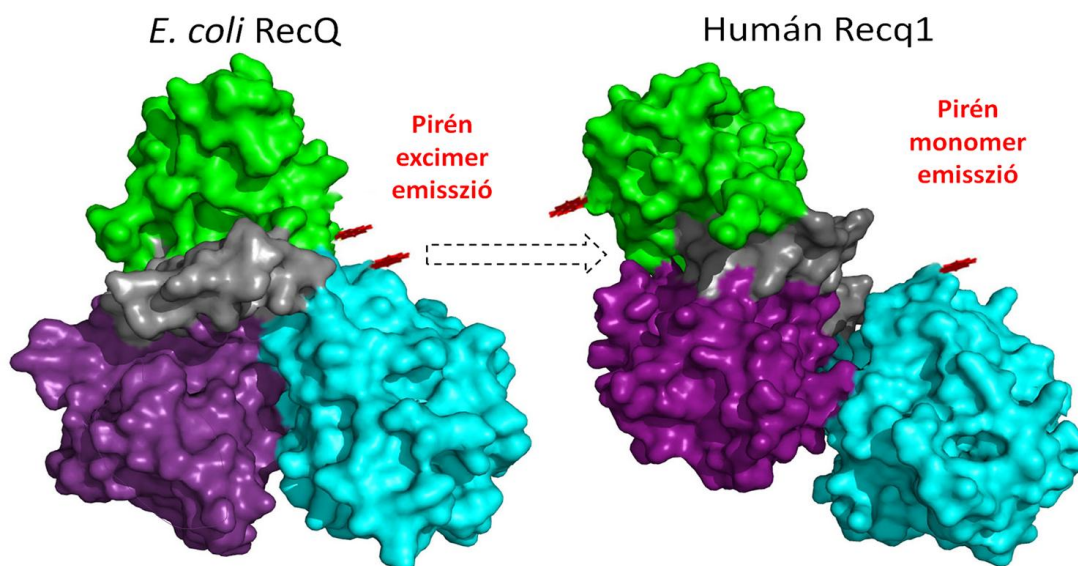
6. ábra: A RecQ DNS-kötésének hőmérséklet függése: **A**, RecQ (0,5 μM) és dT₅₄ (81 μM) reakció első fázisának sebességi állandói 5 °C-on (kék) és 25 °C-on (piros). A két ellentétes irányú sebességi állandó ugyanolyan mértékben nő a hőmérséklet növekedésével, így hányadosuk, K_1 nem változik szignifikánsan (**B** panel). **B**, Kötési tulajdonságok változása hőmérséklettől függően (színek, mint az **A** paneleken). Magasabb hőmérsékleten magasabb a lassú fázis hozzájárulása és több a teljes fluoreszcencia csökkenés is. K_{eq} összegzett egyensúlyi állandó viszont endoterm módon csökken a hőmérséklet növelésével.

Pirén excimer jelölés

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy az előzőekben megfigyelt RecQ izomerizáció a Recq1-szerű WH domén elfordulásból származik-e (lásd RecQ helikázok szerkezete és mozgásai c. fejezet) dupla pirén jelölést alkalmaztunk. Egyazon fehérjét két ponton fluoreszcens pirén jelölőmolekulával kapcsolva értékes adatokra tehetünk szert a

fehérje belső mozgásairól az excimer jel felhasználásával. Az excimer (vagy excited-state dimer) egy olyan szerkezet, mely egy betöltött elektronpályájú, gerjesztett atom/molekula és egy másik atom/molekula kapcsolódásával jön létre. A betöltött elektronpályájú molekulának gerjesztéskor párosítatlan elektronja keletkezik, ami ideiglenes kötést tud létrehozni egy másik molekula párosítatlan elektronjával. Ez alapállapotban, gerjesztés nélkül nem lenne lehetséges. Amikor a gerjesztett elektron visszaesik az eredeti, alapállapotú pályájára, az emisszió nem csak a szokásos (gerjesztési és az alapállapotú elektronpálya különbségéből adódó) hullámhosszon, hanem egy excimer hullámhosszon is történik. Az alapállapotba való visszatéréskor az excimer legtöbbször szét is esik. Két pirén molekula is képes excimer képzésre, de csak amennyiben párhuzamosan helyezkednek el a gyűrűk síkjai, és elég közel vannak egymáshoz (85,86).

Tehát a RecQ fehérjén két pirén fluoreszcens jelölőmolekulát helyezünk el, egyiket az N-terminális RecA doménen, a másikat a WH doménen. Amennyiben kísérleteink során azt tapasztaljuk, hogy az emissziós spektrumban jelen van az excimer csúcs, majd DNS hozzáadására eltűnik, az a két domén eltávolodását jelzi. (7. ábra).

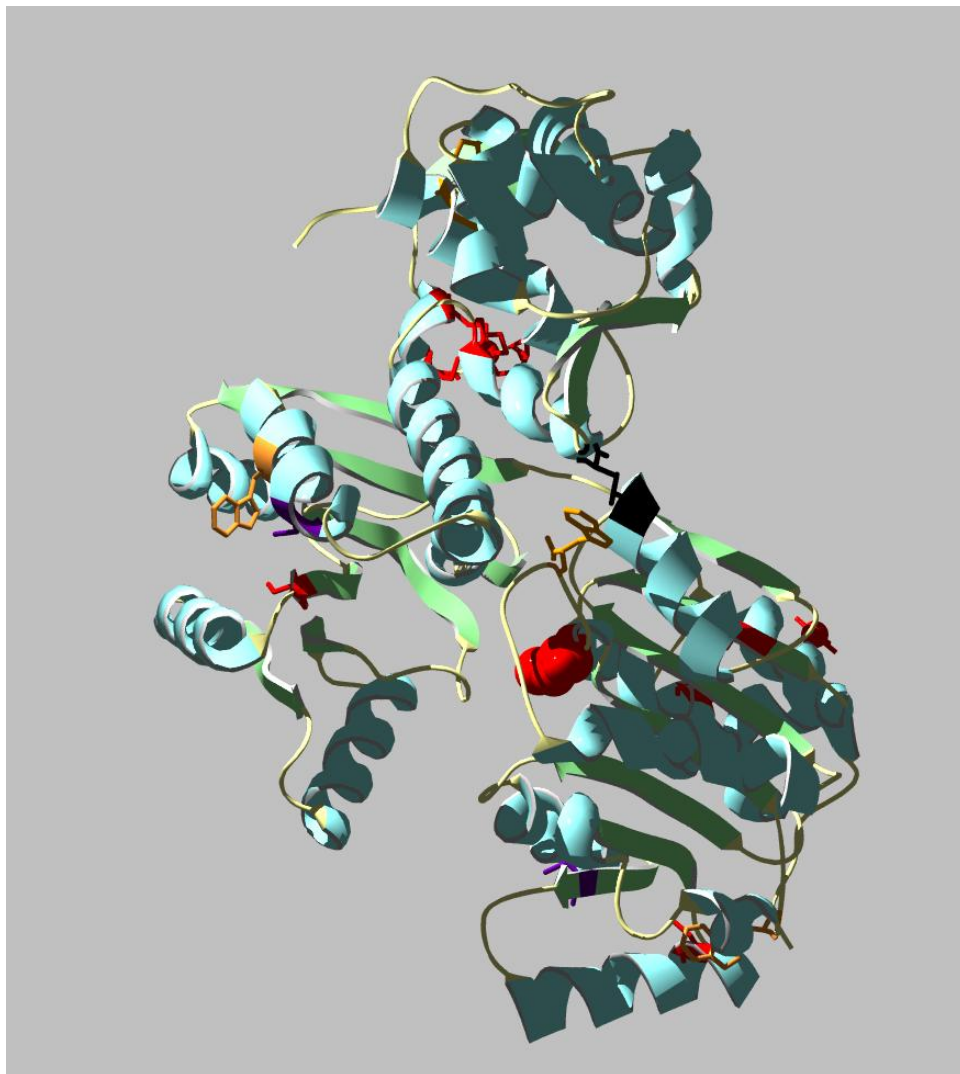


7. ábra: A RecQ feltételezett doménmozgásai, és a pirének eltávolodása: Az ábrán a RecQ fehérje (HRDC domén nélküli) kristályszerkezetének térkitöltős modellje látható a kiválasztott doméneken levő pirén jelölésekkel (a molekulák nem teljesen méretarányosak a jobb láthatóság kedvéért). A pirén gyűrűk pirossal, a RecA domének kézzel és lilával, a ZB domén szürkével, a WH domén zölddel látszanak. Az ábra másik felén a Recq1 fehérje DNS-kötött

állapotú szerkezete látszik hasonló színezéssel. A pirén molekulák ott helyezkednek el, ahol a RecQ fehérjében lennének, így demonstrálva a RecQ szerkezet esetleges megváltozását.

Cisztein mutánsok előállítása

Annak érdekében, hogy a pirén excimer jel detektálható legyen, és esetleges eltűnése által megfigyelhessük a RecQ fehérjemolekulán belüli mozgásokat, megfelelő közelségben kellett elhelyezni a pirén jeleket. A pirén fluoreszcens jelölő molekulát pirén-jódacetamid, illetve pirén-maleimid reagenssel kívántuk bevinni, mely igen szelektív reagens, így cisztein aminosavakat kellett választanunk. A WH doménen, és a C-terminális felőli RecA doménen nem volt olyan cisztein, ami megfelelő közelségben lett volna, így mutációkkal kellett új ciszteinek beépíteni: ennek célpontjául a 187-es treonin (RecA doménen), és a 487-es alanin (WH doménen) szolgált. A jelölés szelektívvé tételéhez szükséges volt két, a RecQ fehérjében természetes módon jelenlévő cisztein kicserélése, melyek a molekula felszínén könnyen elérhetőek lettek volna a jelölő reagens számára. Megjegyzendő, hogy az Ec RecQ molekulában 12 darab cisztein található (**8. ábra, 2. táblázat**), és ebből négy a ZB doménben közel helyezkedik el a felszínhez, de mivel ezek szerepet játszanak a Zn^{2+} ion koordinálásában, ezek a ZB domén szerkezetstabilizáló szerepe miatt nem kicserélhetők. A 351-es ciszteint (ZB doménben, de nincs szerepe a Zn^{2+} koordinálásában) szerinre cseréltük, mert így meg lehetett őrizni a hidrogénkötést, amelyet a cisztein alkotott, a 94-es ciszteint (N-terminális RecA doménben) pedig alaninra cseréltük. Az így létrejövő négy helyen megváltoztatott mutánst (C94A, T187C, C351S, A487C) 4CRecQ-nak neveztük el. Kontroll mérésekhez klónoztuk az egy-egy cisztein bevitelével és kettő kiiktatásával létrehozott mutánsokat is, 187C-RecQ (C94A, T187C, C351S) és 487C-RecQ (C94A, C351S, A487C) néven. A mutánsok preparálása nem különbözött a vad-típusú RecQ fehérjétől.



8. ábra: Ciszteinek és triptofánok a RecQ térszerkezetben:

A RecQ fehérje Bernstein-féle térszerkezetében (33) pirossal a cisztein aminosavakat jelöltük, amelyeket nem változtattunk meg, lilával azon ciszteineket, amik felületi, kitett jellegük miatt eltávolításra kerültek (C94, C351), feketével színezett a két ciszteinre cserélt aminosav (T187, A487). Narancssárgával a triptofánok látszanak. Piros, térkitöltős jelöléssel egy, a kötőhelyre kapcsolódott ATP látható.

2. táblázat: Ciszteinek a RecQ molekulában

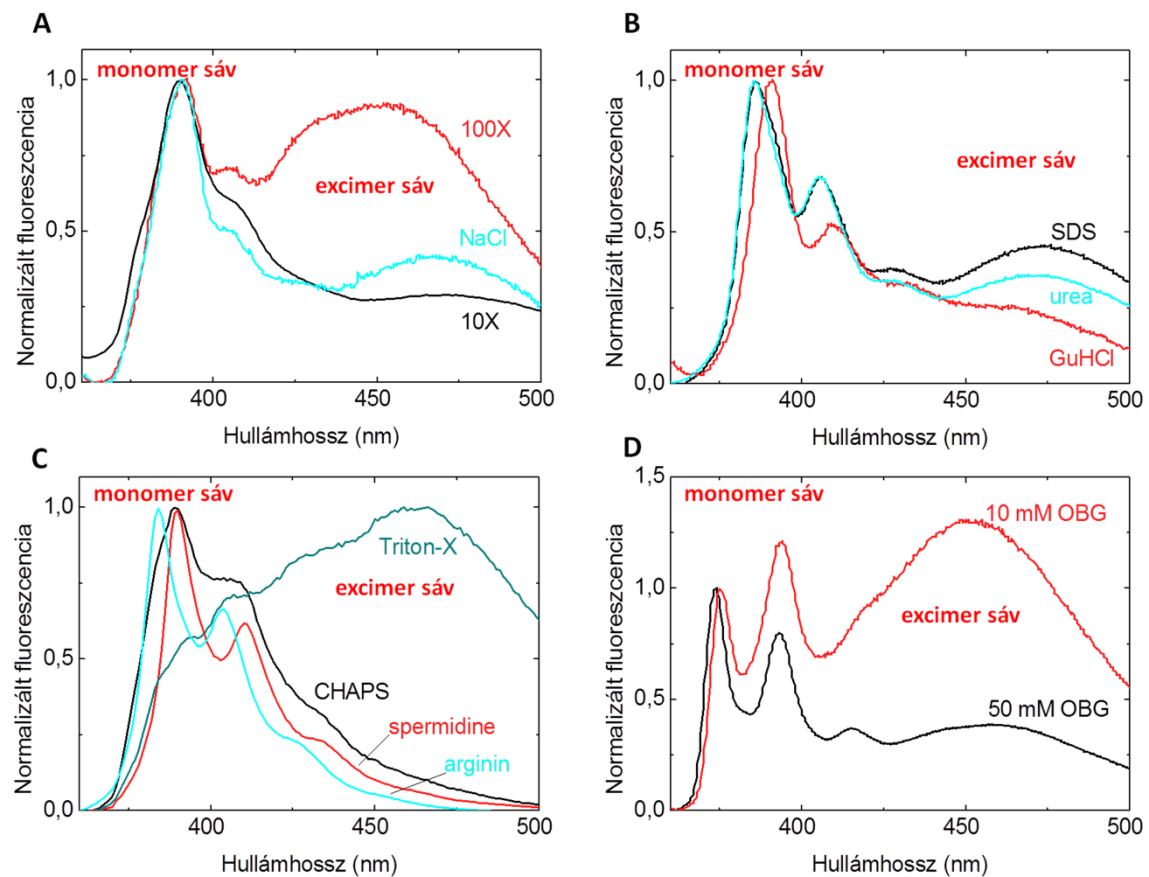
Aminosav	Domén	Kitettség
43	N-terminális RecA	eltemetett
56	N-terminális RecA	eltemetett
94	N-terminális RecA	kitett
111	N-terminális RecA	eltemetett
150	N-terminális RecA	eltemetett
235	C-terminális RecA	eltemetett
243	C-terminális RecA	eltemetett
351	ZB	kitett
380	ZB	Zn ²⁺ -kötésben
397	ZB	Zn ²⁺ -kötésben
400	ZB	Zn ²⁺ -kötésben
403	ZB	Zn ²⁺ -kötésben

Pirén jelölés

Két reagenst használtunk a ciszteinek fluoreszcens jelölésére: pirén-jódacetamidot és pirén-maleimidet. A jelölés minőségének megállapítását fluorimetriás analízissel végeztük, az emissziós spektrumban az excimer csúcs jelenlétét és az excimer, pirén monomer emissziós csúcs arányát figyelembe véve. A pirén abszorbancia sáv (340-350 nm) és a fehérje 280 nm-es abszorbanciájának összehasonlítása csak kevés információkkal szolgál, mert a pirénnek is van abszorbancia csúcsa 280 nm-en, és az általánosan referenciának használt 320 nm-en is elnyelést mutat.

A jelölést először 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ pufferben, 10-20-50-100X moláris pirén-jódacetamid feleslegben alkalmaztuk 2-8-16 óra alatt. (Jelölési kísérletek a **9. ábrán** és az **3. táblázatban**.) Azt tapasztaltuk, hogy a jelölés mértéke egyik esetben sem elegendő, és emellett jelentős fehérjekicsapódás is észlelhető. A továbbiakban a 10X moláris felesleget és 16 órás jelölést alkalmaztuk. A sókoncentráció növelésével a jelöltség mértéke nőtt, azonban az aggregáció igen jelentős mértékű volt. A jelölési kísérletek pufferét innentől 250 mM NaCl-el készítettük. Annak érdekében, hogy a jelölés közben ne kelljen nélkülözni a redukálószer, trisz(2-klóretil)foszfát (TCEP) használható, azonban esetünkben (0,1 - 0,5 mM) nem okozott javulást sem a jelölésben, sem a

stabilitásban. A glicerín és a szacharóz, melyek gyakran használt fehérje stabilizáló pufferkomponensek, csökkentették a jelölési arányt. Feltételezhető volt, hogy bizonyos denaturáló szerek (SDS, GuHCl, urea) kis koncentrációja mellett a jelöltség növekedni, a fehérje aggregációja csökkenni fog, azonban ez nem bizonyult helyes iránynak. A fehérjék aggregációjának gátlásához gyakran használnak arginin, illetve spermidin adalékokat, azonban ezek a 4CRecQ fehérje jelöltségi arányát csökkentették, habár részlegesen meg is óvták a fehérjét a kicsapódástól. A fehérje szerkezetének ideiglenes fellazítását el lehet érni detergensekkel, melyek így a jelölést is elősegítik és a kicsapódást is gátolják. A legsikeresebb ezek közül a Triton-X volt, mely mind a jelölést, mind a stabilitást elősegítette. Azonban a Triton-X nem dializálható ki az oldatokból, mert rendkívül kicsi a kritikus micellaképződési koncentrációja (CMC), micellaként pedig túl nagy a dializáló hártványon való átjutáshoz. Hasonlóan nem-ionos detergens, amelynek CMC-je azonban sokkal nagyobb, a n-oktil- β -D-glükopiranozid (OBG) detergens, melynek használata jelentős javulást hozott mind a jelöltségben, mind a stabilitásban. Ez utóbbi kísérleteket az excimer fluoreszcencia jelben megjelenő erős fotokioltság jelenség kiküszöbölése miatt már pirén-maleimiddel végeztük (ez a reagens merevebb szerkezettel bír), ez a változás azonban kísérleteink szerint nem befolyásolta a jelölés folyamatát.



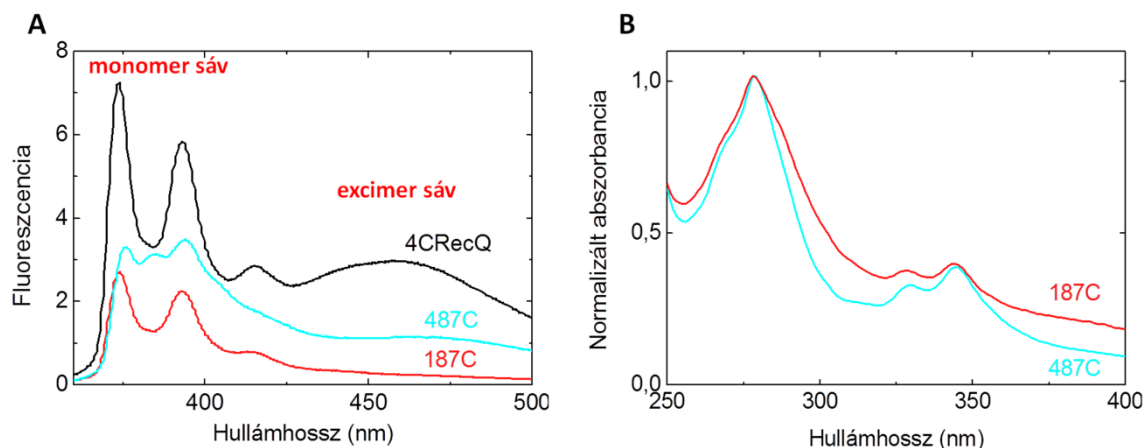
9. ábra: A 4CRecQ fehérje pirén jelölése emissziós spektrumokon: **A**, 10X (fekete), illetve 100X (piros) moláris feleslegben pirén-jódacetamid (200 mM NaCl mellett), illetve 10 X felesleg és megnövelt (250 mM) NaCl (kék) alkalmazásával jelölt 4CRecQ fehérjék emissziós spektrumai. **B**, SDS (1,5 mM), GuHCl (0,3 M) és urea (1 M) denaturáló szer mellett jelölt 4CRecQ fehérjék (fekete, piros, kék színekkel jelölve) spektrumai. **C**, CHAPS (1 %), Arginin (1 M), spermidin (100 mM) és Triton-X (0,2 %) adalékkal jelölt 4CRecQ fehérjék (fekete, piros, kék, zöld színekkel jelölve) emissziója. **D**, 50 mM (fekete) és 10 mM (piros) OBG detergens jelenlétében pirén-maleimiddel jelölt 4CRecQ fehérje emissziós spektruma.

3. táblázat: 4CRecQ fehérje pirén jelölése

Jelölés módja	Jelöltség (maximum excimer/monomer pirén csúcs)	Kicsapódás valószínűsége (%) ^a
pirén 10X; 2,8,16 óra	0,28	89
pirén 100X; 2,8,16 óra	0,93	95
250 mM NaCl	0,41	90
50 mM Tris- HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ ; 10X pirén; 16 óra		
+ glicerín	0,08	20
+ szacharóz	0,05	40
+ SDS	0,45	50
+ GuHCl	0,25	50
+ UREA	0,36	50
+ CHAPS	0,09	10
+ Spermidin	0,05	50
+ Arginin	0,01	50
+ Triton-X	0,97	10
+ 50 mM OBG	0,38	10
+ 10 mM OBG	1,31	10

^a A kicsapódás valószínűségét a több párhuzamos kísérlet esetén az aggregáció előfordulásának arányából, illetve a részben aggregálódott minták koncentráció csökkenéséből becsültem.

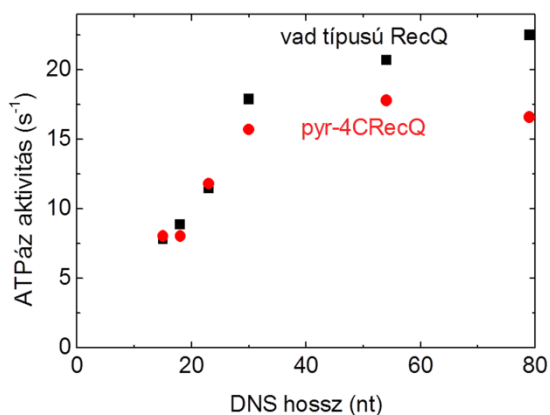
Az egyszeres cisztein bevitellel készült, 187C és 487C egyszeres pirén-jelölt, kontrollként szolgáló mutánsok (lásd Mutánsok előállítása fejezet) ugyanezen 10 mM OBG tartalmú környezetben pirén-maleimiddel már könnyen jelölhetőek. Ezen mutánsok esetében a fluoreszcencia emissziós és az abszorbanancia spektrumban is látható volt a pirén csúcs megjelenése (10. ábra). Az emissziós spektrumban nem jelent meg az excimer csúcs, ami arra utalt volna, hogy a célzott ciszteineken kívül is van jelölődés, átlapolás.



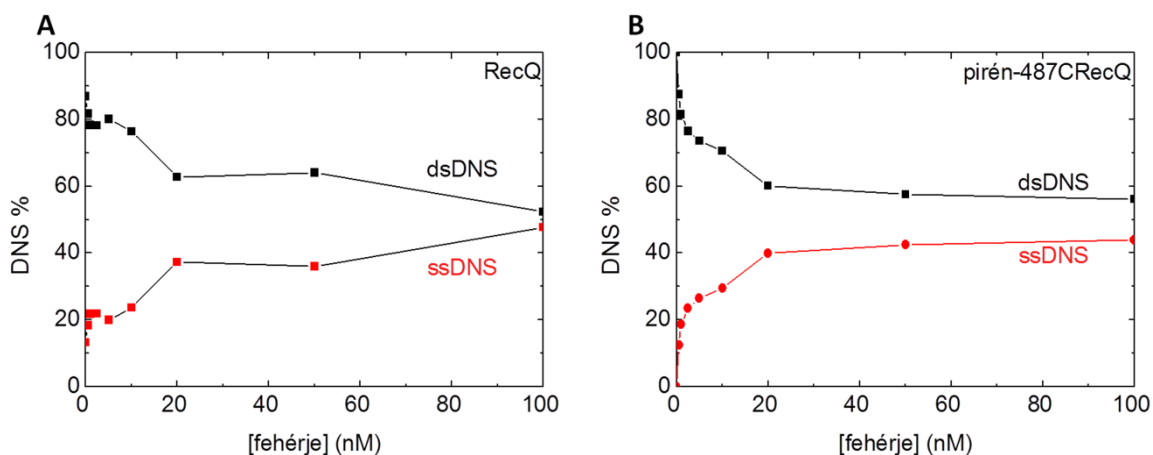
10. ábra: Egyszeresen pirén-jelölt mutánsok spektrumai: A, Emissziós spektrumok a duplán jelölt 4CRecQ (fekete), jelölt 187C (piros) és 487C (kék) mutánsok esetében. A 4CRecQ esetében monomer pirén és excimer csúcsok is láthatóak, míg az excimer jel az egyszeresen jelölt mutánsoknál hiányzik. **B,** A RecQ mutánsok (5 μ M) (pirossal a 187C mutáns, kékkel a 487C mutáns jelölve) abszorbananciája 280 nm-nél a fehérjékre és a pirénre jellemző, 340-350 nm körül pirénre jellemző csúcsot mutat.

Jelölt mutánsok aktivitásának megőrződése

Annak igazolására, hogy a mutáns fehérjék ugyanolyan módon működnek, mint a vad-típusú RecQ fehérje, ATPáz és DNS-szálszétválasztási kísérleteket végeztünk. Mindhárom cisztein mutáns (4CRecQ, 187C, 487C) esetében a fehérje jelölése után az ATPáz aktivitás nem változott, sem szubsztrát-mentes körülmények között, sem dT₅₄ jelenlétében. Az ATPáz aktivitás DNS hosszúságtól való függése, mely fontos mechanisztikus információt közöl (47) szintén megőrződött (11. ábra). A szálszétválasztás is hasonló volt a vad-típusú, jelöletlen RecQ-éhoz (12. ábra).



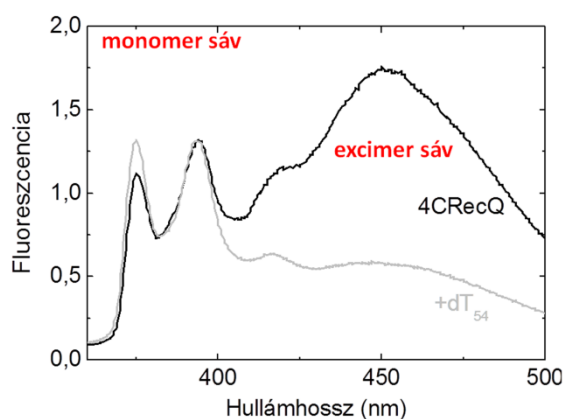
11. ábra: ATPáz aktivitás megőrződése: Az ATPáz értékek a vad típusú RecQ fehérje (fekete) és a duplán pirén-jelölt 4CRecQ fehérje (piros) (15 nM fehérje) esetében nem különböznek szignifikánsan egyetlen DNS hosszúságon (1 μ M) sem.



12. ábra: Szálszétválasztó aktivitás megőrződése: A-B, Növekvő fehérje koncentrációt 54 bázis hosszúságú dsDNS-hez (5'-Cy3 jelölt) adagolva a reakciót (37 °C) 10 perc után EDTA-val (100 mM) leállítjuk. Akrilamid gélen elektroforézálva és denzitometriás kiértékelés után másodfokú függvényt illesztettünk (fekete vonal), mind a ds (fekete négyzet), mind a ssDNS-nek (piros kör) megfelelő mérési pontokra. Az **A** ábrán feltüntetett vad-típusú fehérje, és a **B** ábrán példaként megjelenő jelölt 487C mutáns láthatóan hasonló szálszétválasztási aktivitással rendelkezik.

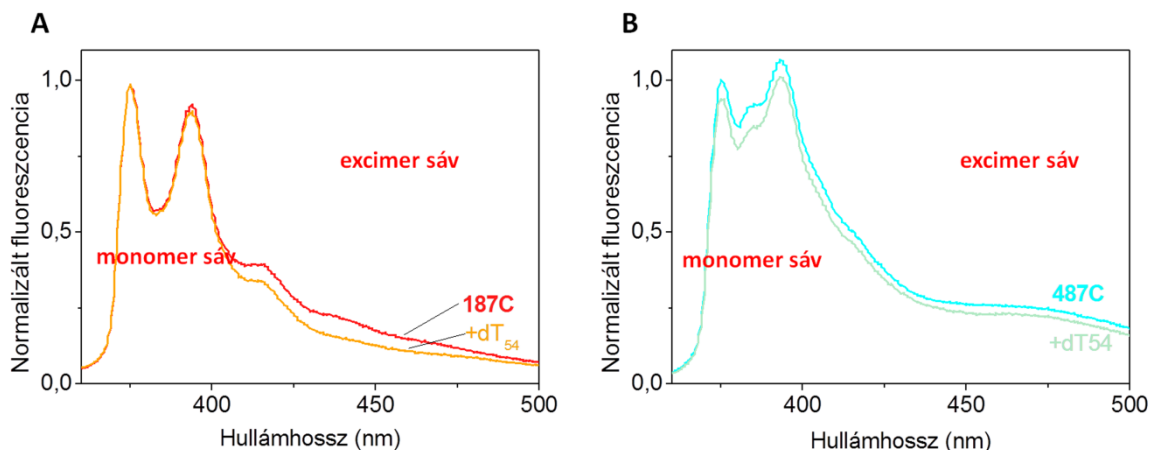
A DNS hatása

Steady-state fluoreszcenciás mérésekben a duplán pirén-jelölt 4CRecQ fehérje emissziós spektrumában (**13. ábra**) erősen lecsökkent az excimer csúcs aránya dT₅₄ DNS hozzáadásának hatására. Kis mértékű vöröseltolódás volt tapasztalható. A monomer pirén csúcsok továbbra is láthatóak voltak, esetenként a monomer csúcsok aránya változott.



13. ábra: DNS hatása a duplán pirén-jelölt 4CRecQ emissziós spektrumára: Az ábrázolt emissziós spektrumokból látható, hogy dT₅₄ (1 μ M) DNS hatására az excimer csúcs intenzitása drasztikusan csökken, ami az excimer szerkezetek DNS-indukált eltűnését jelzi.

187C és 487C mutánsokra jellemző volt, hogy nem mutattak excimer emissziót. Ezenkívül az ssDNS csökkentette a fluoreszcenciájukat, de a spektrum tartományainak intenzitásaránya nem változott.

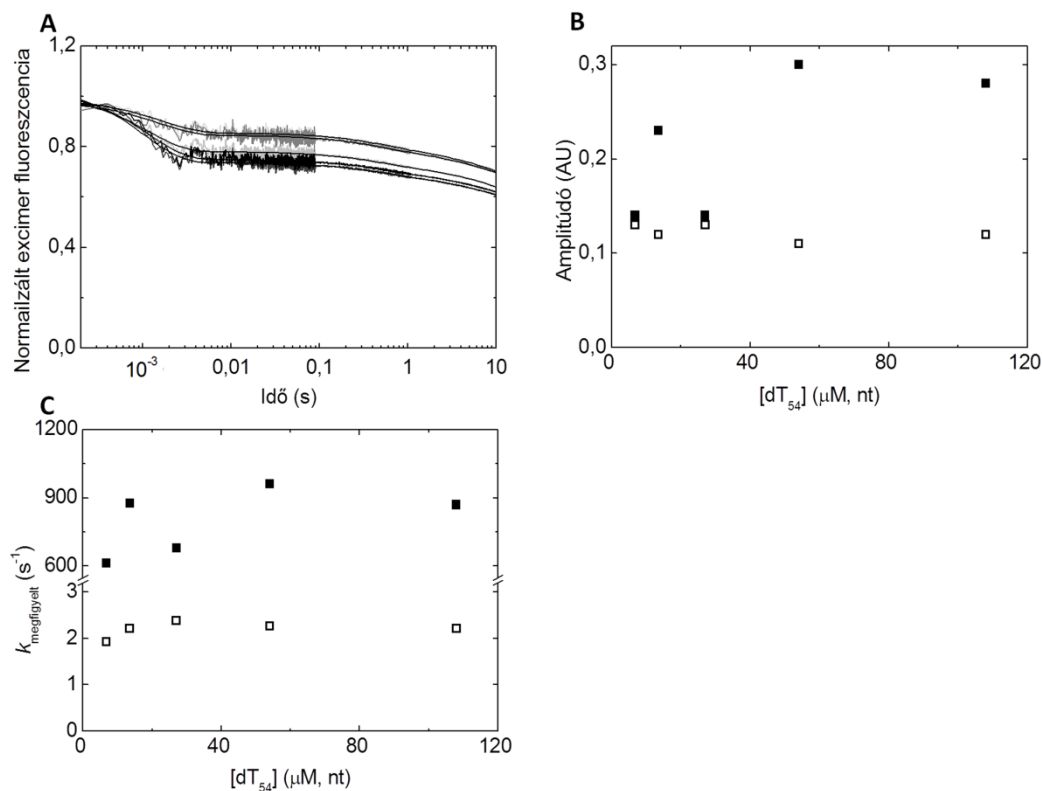


14. ábra: *DNS hatása az egy cisztein bevitelével előállított, jelölt mutánsokra: A-B, Fluoreszcencia emissziós spektrumok a pirén gerjesztési hullámhosszán gerjesztve (346 nm) a 187C (A) és a 487C (B) mutáns esetében (0,5 μ M). DNS hozzáadásával (világosabb szín) (1 μ M dT₅₄) kis mértékben csökken a fluoreszcens jel, de a spektrum alakjában nem megy végbe változás.*

Stopped-flow excimer jellel

Stopped-flow készülékben összekeverve a duplán jelölt 4CRecQ fehérjét dT₅₄ DNS-el megállapítottuk, hogy a duplán pirén-jelölt RecQ4C fehérje DNS-kötési stopped-flow görbéje háromfázisú, azonban a harmadik fázis megtalálható a DNS-mentes kontrollban is, fotokioltság jelenségnek tudható be. Ezenkívül a leggyorsabb, első fázis sebességi állandói igen hasonlítanak a Trp fluoreszcencia mérésekből adódóakkal. A második fázis sebességi állandói azonban lassabbak a Trp fluoreszcenciával mértnél.

A kis számú DNS koncentráció, amit alkalmaztunk, nem teszi lehetővé, hogy megállapítsuk a DNS-kötés pontos mechanizmusát, azonban mégis valószínűsíthető, hogy egy másik, lassabb izomerizációt sikerült detektálni ezzel a módszerrel. Ez azt sugallja, hogy a Trp fluoreszcenciával detektált izomerizáció nem a WH doménelfordulásból következik, azonban ennek megállapításához szükséges lenne a pirén-jelölt 4CRecQ fehérje DNS kötésének Trp fluoreszcencia jel által való követése.



15. ábra: A duplán pirén-jelölt 4CRecQ DNS-kötése: **A**, Stopped-flow készülékben duplán pirén-jelölt 4CRecQ (0,2 μM), és különböző koncentrációjú dT₅₄ DNS (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 μM egyre sötétedő színnel jelölve) gyorskeverését végeztük el 5 °C-on, miközben az excimer fluoreszcencia jelet detektáltuk. A kapott görbékre három exponenciálist illesztettünk, ezeket fekete vonalak jelölik. **B-C**, Amplitúdók (**B**) és megfigyelt sebességi állandók (**C**) DNS koncentráció függése.

4. táblázat: A 4CRecQ DNS-kötésének kinetikai állandói

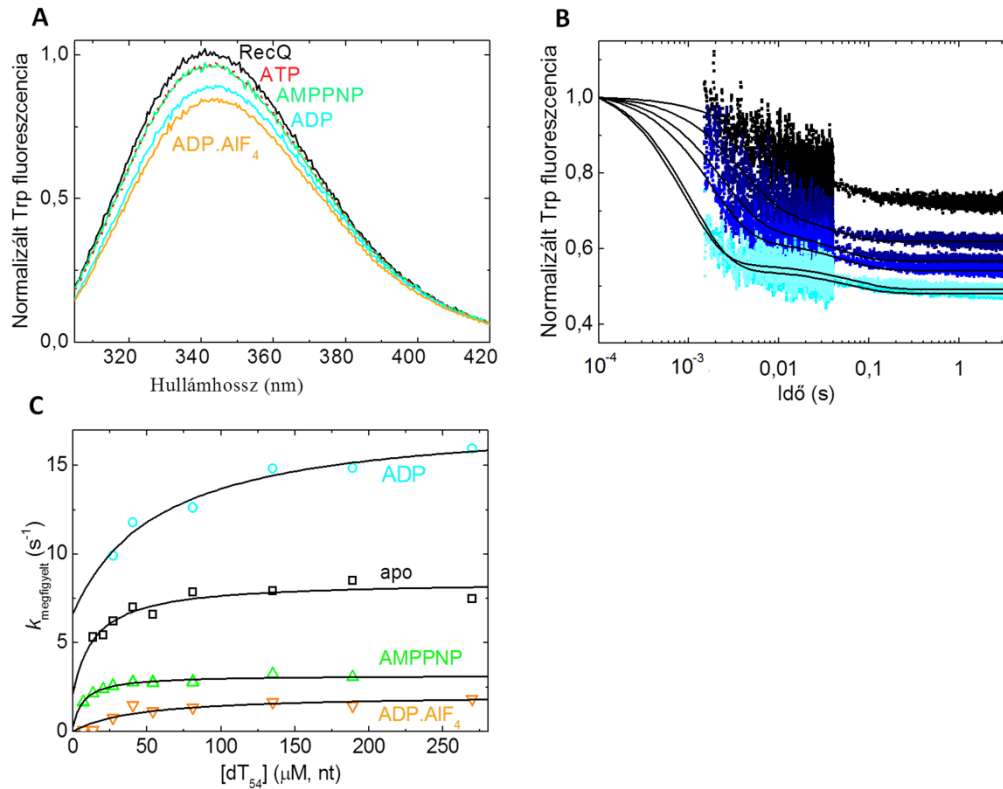
dT_{54} (μ M)	A_1	A_2	A_3	k_1 , megfigyelt	k_2 , megfigyelt	k_3 , megfigyelt	Teljes fluoreszcencia csökkenés (%)	Lassú fázis fluoresz- cencia csökkenése (%)
0,13	0,14	0,13	0,06	613,50	1,93	0,10	33,4	40,2
0,25	0,23	0,12	0,05	877,19	2,22	0,12	40,1	30,7
0,50	0,14	0,13	0,06	680,27	2,38	0,13	31,8	39,8
1,00	0,30	0,11	0,05	961,54	2,26	0,12	46,2	24,4
2,00	0,28	0,12	0,05	869,57	2,21	0,12	44,1	26,4

1. konklúzió:

Trp fluoreszcencia mérések által kimutattuk a RecQ helikáz kétlépéses DNS-kötését, mely endoterm, nem DNS hossz függő reakciónak mutatkozott. Pirén excimer jelölt RecQ mutánsokkal bizonyítottuk a RecQ kétlépéses DNS-kötését, de feltételezhetően egy másik izomerizációs lépést detektáltunk.

III/2. Nukleotidok hatása a RecQ DNS-kötésére

A RecQ fehérje steady-state fluoreszcenciája Sarlós Kata méréseiben nukleotid állapot függő volt (**16. ábra**). Stopped-flow mérésekben a második lépés nukleotid állapottól való függése tűnt ki. Ez egyértelműen arra utal, hogy ez a lépés az ATP hidrolízis közben végbemenő konformációváltozásoktól függ. A kezdő DNS-kötési lépésben minden nukleotid állapot, az ADP.AIF₄ állapot kivételével hasonlóan mutatkozott (**5. táblázat**). Ez esetben ugyanis sokkal lassabbnak találtuk a reakciót, az egyensúlyi állandó megváltozása nélkül (**1. táblázat**). A legjelentősebb változás, hogy az ADP.AIF₄ nukleotid analóg esetében az izomerizáció visszaalakulásának (k_{-2}) drasztikus lassulását tapasztaltuk, ami igen nagy ssDNS-affinitás növekedést okozott (**5. táblázat**). A DNS-kötési sztöchiometriával együtt ez a kinetikai különbség egy, az egyéb nukleotid állapotokénál nagyobb DNS-en elfoglalt kötőhely-méretet mutat a RecQ.ADP.AIF₄ komplexre nézve (**5. táblázat**). Az ADP.AIF₄ nukleotid analógot eddig különböző publikációkban különböző ATPáz ciklus köztiállapotként azonosították (87,88). Mivel a RecQ.ADP.AIF₄ komplex tulajdonságai a RecQ.AMPPNP prehidrolízis állapottól lényegesen különböztek, úgy gondoljuk, hogy vagy egy ATP hidrolízis köztesállapotot, vagy egy poszthidrolitikus, ADP.P_i-kötött állapotot képvisel. Ezen eredményeink azt sugallják, hogy a RecQ helikáz ATP hidrolízise konformációváltozással jár, amely magában foglalja a DNS-kötő régió záródását. Ez a szerkezeti változás pedig kapcsolt lehet a DNS-en való transzlokáció egy mechanikai lépésével.



16. ábra: A RecQ helikáz DNS-kötése különböző nukleotid állapotokban: **A**, Steady-state Trp fluoreszcencia emissziós spektrumok a RecQ helikáz (3 μM) különböző nukleotid állapotaiban. A nukleotid-mentes állapot feketével, az ATP (1 mM) jelenlétében pirossal, AMPPNP-vel (200 μM) zölddel, ADP-vel (1 mM) kézzel, és a $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4$ (1 mM) kötött állapot narancssal színezve látható. **B**, Stopped-flow görbék ADP-kötött RecQ (0,5 μM) fehérje és növekvő koncentrációjú (13,5; 27; 54; 81; 108 and 378 μM) dT_{54} keverésével (egyre halványuló kék színnel). (Az ADP 100 μM -ben volt jelen.) A görbéket a DNS-mentes állapotra normalizáltuk. Az illesztett kétexponenciális görbék fekete folytonos vonalként látszanak. **C**, A lassabb fázis megfigyelt egyensúlyi állandói az ssDNS koncentráció függvényében. A nukleotid-mentes állapot négyzettel, ADP jelenlétében (100 μM) körrel, AMPPNP-vel (100 μM) álló háromszögekkel, $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4$ -el (500 μM) fordított háromszöggel jelölve, a színek az **A** ábrával egyeznek meg. Az adatpontokra hiperbolát illesztettünk, ennek y-tengelymetszetéből a visszaalakulás sebessége, asszimptotájából az oda és visszaalakulás sebességi állandóinak összege számolható. Ezek a mérések 25 °C-on történtek, Sarlós Kata doktorijában szereplő adatok újraértékeléséből származnak (lásd „A RecQ kétlépéses DNS-kötése” fejezetet). A számolt adatok és állandók az **5. táblázatban** találhatóak.

5. táblázat: A RecQ helikáz DNS-kötő tulajdonságai különböző nukleotid állapotokban ^a

Paraméterek	Meghatározás módja	Nukleotid-mentes	AMPPNP	ADP	ADP.AIF ₄
Teljes DNS-indukált fluoreszcencia csökkenés (% a DNS-mentes állapothoz viszonyítva) ^b	Trp spektrum ^c	65 ± 4	69 ± 4 (5 ± 1)	62 ± 4 (11 ± 1)	70 ± 3 (17 ± 2)
	Amplitúdók	59 ± 1	61 ± 1	51 ± 2	62 ± 2
A lassú fázis hozzájárulása (a teljes csökkenés %-ban)	Amplitúdók	49 ± 7	56 ± 3	14 ± 10	53 ± 2
A DNS-kötés sztöchiometriája (nt/RecQ)	Amplitúdók	20 ± 3	14 ± 8	14 ± 3	40 ± 18
	EMSA ^b	32 ± 10	41 ± 10	44 ± 21	60 ± 30
k_1 (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Kötési kinetika	7,8 ± 1,7	5,0 ± 0,6	9,1 ± 0,6	0,76 ± 0,07
k_{-1} (s ⁻¹)	Kötési kinetika	140 ± 110	88 ± 19	140 ± 20	10 ± 7
K_1 (μM)	k_{-1}/k_1	18 ± 18	18 ± 6	15 ± 3	13 ± 10
$k_2 + k_{-2}$ (s ⁻¹)	Kötési kinetika	8.5 ± 3.0	3.2 ± 0.4	18 ± 5	2,0 ± 0,3
k_{-2} (s ⁻¹)	Kötési kinetika	2,2 ± 3,3	0,30 ± 0,50	6,7 ± 2,7	< 0,1
	DxSO ₄ chasing ^d	4,1 ± 0,3	0,40 ± 0,03	12 ± 1	< 0,01
	Heparin	4,2 ± 0,8	0,89 ± 0,03 ^f	10 ± 2	< 0,01

	chasing ^e				
$K_{eq} (\mu M)^g$	$K_1/(K_2+1)$	$7,4 \pm 8,0$	$3,0 \pm 1,7$	$8,0 \pm 2,1$	$< 0,065$
	Amplitúdók	< 5	< 5	< 5	< 5

^a 25°C, dT₅₄, RecQ (0,5 μM) stopped-flow Trp fluoreszcencia adatok (kivéve EMSA). A paraméterek elnevezése az **1. sémára** utal. Minden mértékegységgel jelölt paraméter a koncentrációkat is beleértve az nt-ben megadott DNS koncentrációkból adódik.

^b A DNS-mentes RecQ-nukleotid komplex Trp fluoreszcenciájához viszonyítva.

^c A zárójelben feltüntetett értékek a DNS nélküli nukleotid hatására végbemenő kioltást mutatják.

^d [DxSO₄] = 0,1 mg/ml koncentráción meghatározva

^e Nulla heparin koncentrációra extrapolált értékek.

^f ATPγS (adenozin 5'-(gamma-tiotrifoszfát)) esetén: $3,3 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$.

^g Összesített egyensúlyi DNS-kötési állandó

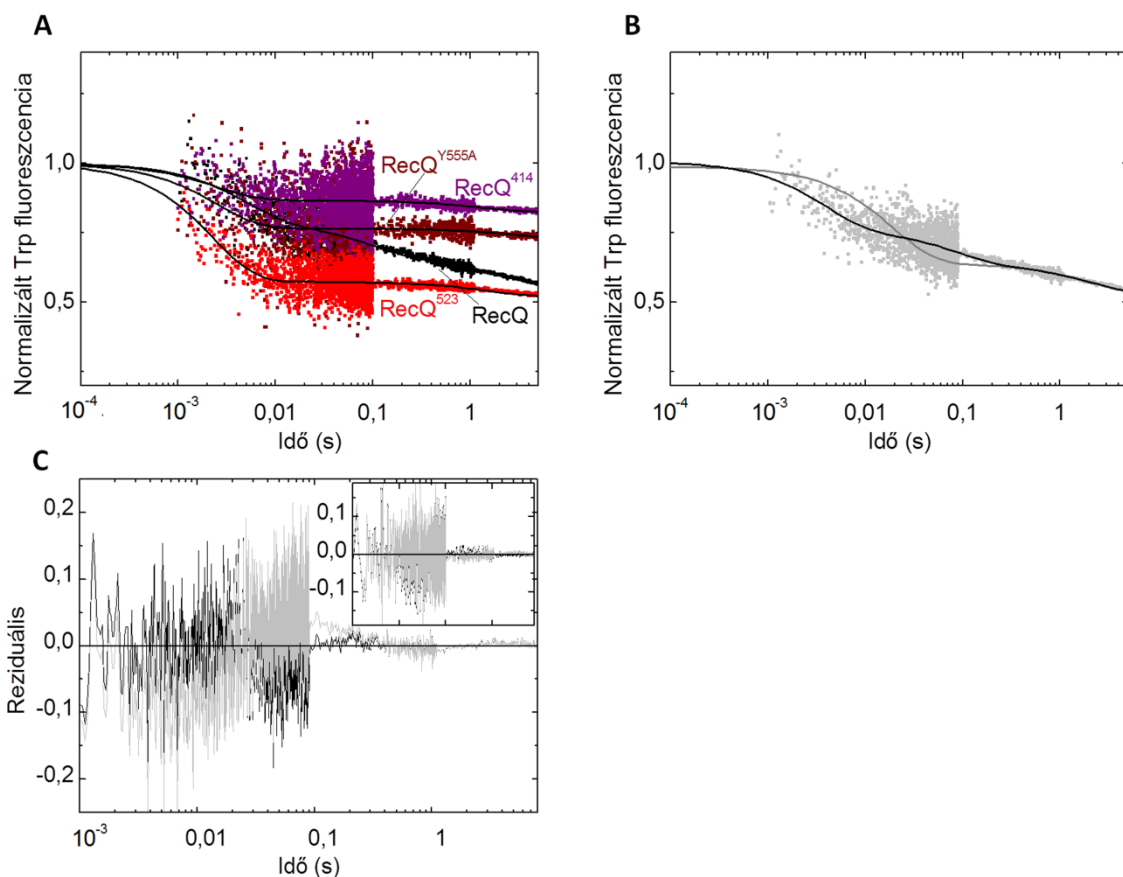
$K_{eq} = ([\text{RecQ} \cdot (\text{N})]_{eq} \cdot [\text{DNS}]_{eq}) / ([\text{RecQ}^+ \cdot (\text{N}) \cdot \text{DNS}]_{eq} + [\text{RecQ}^{++} \cdot (\text{N}) \cdot \text{DNS}]_{eq})$ egyenlet által definiálva
(**1. séma**)

2. konklúzió:

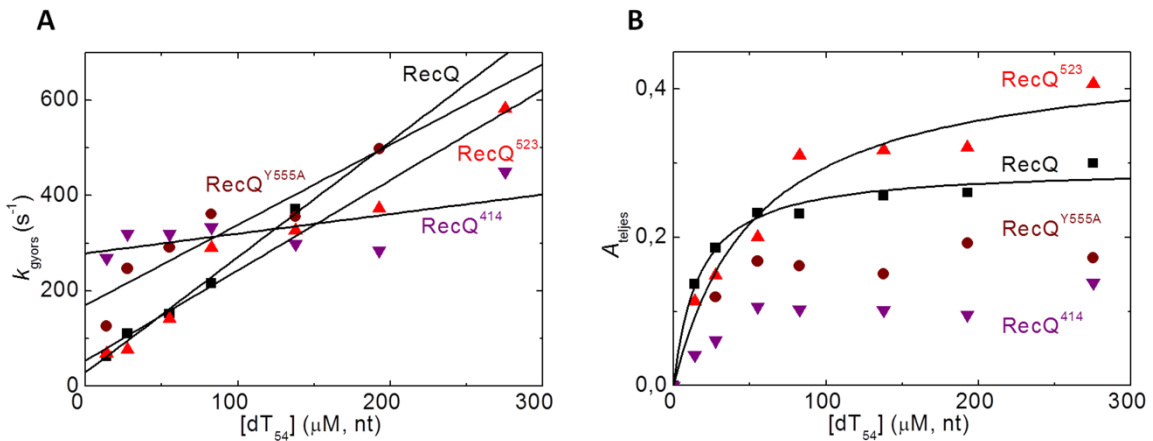
A RecQ fehérje DNS kötése nukleotid állapot függő, legerősebben kötött állapota az ADP·AlF₄, feltételezhetően poszthidrolitikus állapot.

III/3. RecQ helikáz doménjeinek hozzájárulása a DNS-kötés folyamatához

Azért, hogy a DNS-kötés és izomerizáció tulajdonságait a RecQ doménszerkezetéhez kapcsolhassam, RecQ mutánsokkal végeztem kísérleteket. Csoportunkban rendelkezésre állt a vad típusú RecQ fehérje mellett RecQ-d523, és RecQ-d414, ami az adott aminosavval végződik és RecQ-Y555A, melyben az 555-ös tirozint cseréltük alaninre. A RecQ-d523 fehérjéből hiányzik a HRDC, a RecQ-d414 konstrukcióból mind a HRDC, mind a WH domén. Az Y555A mutáció a HRDC domént funkcionálisan gátolja, az ssDNS-kötését gyakorlatilag megszünteti (Bernstein, Keck 2005). A mutánsoknál más és más mértékű csökkenést tapasztaltunk a Trp fluoreszcenciában DNS-kötés hatására, de mindegyiknél tapasztalható volt a csökkenés (**17. ábra**). A RecQ-d414 fehérjéből hiányzik egy Trp (Trp469), ami a WH doménben helyezkedik el, de ezen eredmények szerint nem ez az aminosav szolgáltatja kizárólag a fluoreszcencia jelváltozást. Figyelemreméltó volt, hogy minden mutáns esetében hiányzott a második fázis, az izomerizációs lépés. Elmondható továbbá, hogy a RecQ-d414 különbözött a leginkább a vad típustól, ebben az esetben csökkent a k_1 és növekedett a k_{-1} leginkább. A disszociációs sebességi állandó (k_{-1}) azonban minden mutáns esetében nőtt.

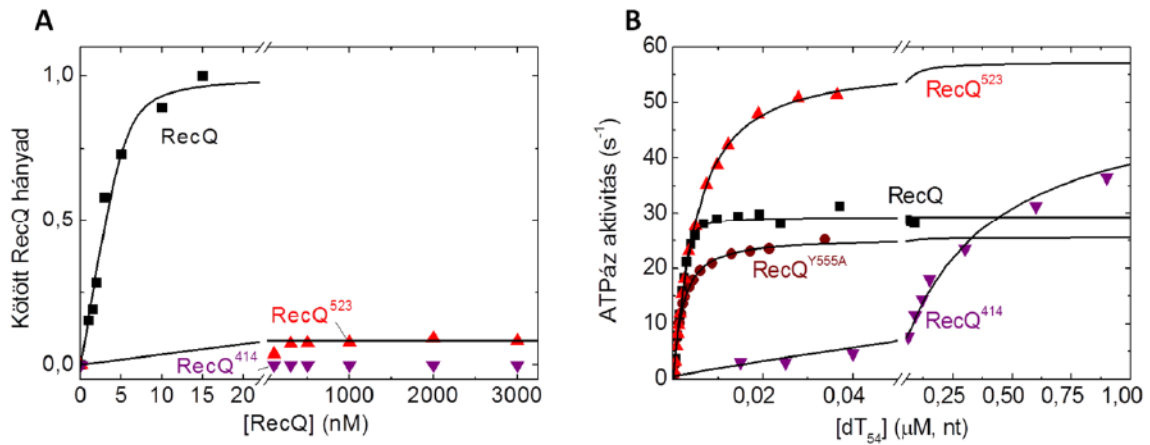


17. ábra: Különböző RecQ konstrukciók DNS-kötése: **A**, Vad típusú (fekete) és mutáns RecQ konstrukciók (RecQ-Y555A vörös, RecQ-d523 piros, RecQ-d414 lila) dT_{54} (81 μ M, nt) kötési stopped-flow görbéi 5 °C-on. A RecQ konstrukciók koncentrációja 0,5 μ M volt, a görbéket a DNS-mentes állapothoz normalizáltuk. A vad típus görbéjére három exponenciális, a mutánsoké két exponenciális görbét illesztettünk. **B-C**, A két (szürke vonal) és három (fekete vonal) exponenciális illesztések összehasonlítása a vad típusú RecQ stopped-flow görbékre (**A** panel). (Az utolsó fázis azonos módon a fotokioltság). Az illesztések reziduálisai a **C** panelben azt mutatják (színezés, mint **B** panelben), hogy a két exponenciális illesztés esetén szisztematikus eltérés tapasztalható az adatpontokhoz képest. A **C** panel mellékpaneljében a RecQ-d523 kötési görbéjének illesztési adatai láthatók, amelyek esetében a kevesebb exponenciális függvény illesztése esetén sincsen szisztematikus eltérés, a két (szürke) és három (fekete) exponenciális illesztés megkülönböztethetetlen. Ez a megállapítás a többi RecQ mutáns fehérje esetében is igaz.



18. ábra: Különböző RecQ konstrukciók kinetikai jellemzői: **A,** A RecQ fehérjék ($0,5 \mu\text{M}$) és dT_{54} ($81 \mu\text{M}$, nt) kötési görbék gyors fázisának DNS koncentráció függvényében ábrázolt megfigyelt sebességi állandói (vad-típus fekete négyzet, RecQ-Y555A vörös kör, RecQ-d523 álló, piros háromszög, RecQ-d414 fordított lila háromszög). A állandó értékeire egyenest illesztettünk. **B,** Ugyanazon RecQ-DNS kötési görbék DNS koncentráció függvényében ábrázolt amplitúdói. (jelölések, mint A panelen). A megfelelően nagy jel/zaj arányú mérésekre (vad-típus, RecQ-Y555A) hiperbolák illeszthetőek (fekete vonal). A méréseket 5°C -n végeztem, a számolt adatok a **6. táblázatban** találhatóak.

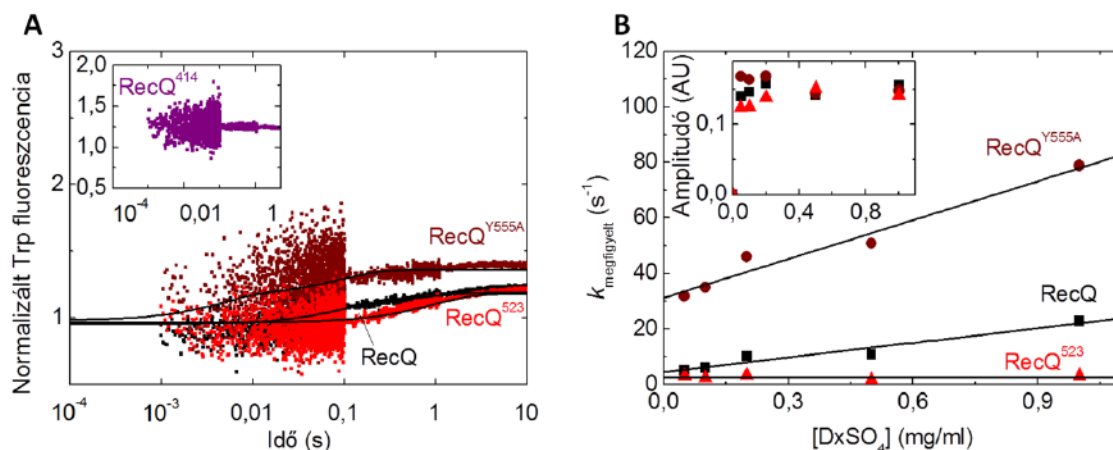
A kötési állandók vizsgálatához elektroforetikus mobilitás változási kísérleteket (Electrophoretic Mobility Shift Assay = EMSA) is végeztem 25°C -on (**19.A ábra**). A kísérletekben növekvő koncentrációjú fehérjét kevertem izotóp jelölt DNS-hez, mely kötött DNS gélben való vándorlási sebessége lelassul, ezáltal elkülöníthető a szabad DNS-től. Ezekben a kísérletekben – az erős kötést mutató vad típusú RecQ-val ellentétben – a RecQ-d523 igen gyenge, a RecQ-d414 alig észrevehető DNS-kötést mutatott. Viszont dT_{54} DNS hozzáadására mindegyik fehérjének jelentősen nőtt az ATP-áz aktivitása (**19.B ábra**). Az RecQ-d523 és RecQ-Y555A nagyon hasonló, de némileg kisebb DNS-affinitással bír a vad RecQ fehérjénél képest, míg a RecQ-d414 sokkal (100X) kisebbel.



19. ábra: Különböző RecQ konstrukciók reakciója DNS-el EMSA és ATPáz mérésekben: **A,** Növekvő koncentrációjú RecQ konstrukciókat (162 nM, nt) izotópjelölt dT₅₄-el keverve EMSA kísérletben a látható kötött RecQ mennyiségeket kapjuk. (RecQ fekete négyzet, RecQ-d523 piros álló háromszög, RecQ-d414 lila fordított háromszög) A vad-típusra másodfokú függvény, a RecQ-d523 esetében egyenes illeszthető. **B,** RecQ konstrukciók növekvő DNS koncentráció függvényében ábrázolt ATPáz aktivitásai (jelölés, mint A ábrán, és RecQ-Y555A vörös kör). Az adatokra másodfokú (vad, RecQ-Y555A) és hiperbolikus (RecQ-d523, RecQ-d414) függvények illeszthetők. A RecQ 15 nM, mutáns RecQ konstrukciók 10 nM koncentrációban voltak jelen. A méréseket 25 °C-on végeztem, a 3. táblázatban található az illesztésekből kapott paraméterek.

Annak érdekében, hogy ezen tulajdonságokat tovább karakterizáljam, leszorításos (chasing) kísérleteket végeztem. Ezeknek a kísérleteknek a lényege, hogy a DNS-ről leeső fehérjét „megkötjük”, hogy ne kapcsolódjon újra a DNS-hez. Így tehát minden fehérje csak egy futást vihet véghez a DNS-en. Az ilyen kísérletekben fehérjecsapdák leggyakrabban polianionok, a DNS-t utánozzák, mint a heparin és a DxSO₄. A megfigyelt k_{obs} DxSO₄ koncentráció függéséből kisebb k_{off} következik, mint a k_{-1} értékek, amelyeket a kötési kísérletekből határoztunk meg. Azonban a mutánsok közti tendenciák hasonlóak voltak, a vad típusú RecQ és a RecQ-d523 hasonlóan bizonyult, míg a RecQ-Y555A mutáns fehérjét többszörösen felgyorsult disszociáció jellemezte. A RecQ-d414 fehérjénél nem volt tranziens megfigyelhető, azonban a DxSO₄-mentes kontrollokhoz képest a fluoreszcencia szint jelentősen magasabb volt. Ezt összevetve a kötési kísérletekben megállapított magas k_{-1} értékekkel elmondható, hogy a kiindulási oldatban a RecQ-d414 nagy része nem volt DNS-

hez kötve, illetve, hogy a szabad RecQ-d414 fehérje DxSO_4 -hez való kötése a holtidő (1 ms) alatt következhetett be.



20. ábra: Különböző RecQ konstrukciók DNS-ről való disszociációja: **A,** Trp fluoreszcencia változások stopped-flow rendszerben poli-dT kötött RecQ konstrukciók és DxSO_4 keverésekor. ($0.5 \mu\text{M}$ RecQ, $25 \mu\text{M}$, nt poly-dT, 1 mg/ml DxSO_4) Vad-típusú RecQ feketével, RecQ-Y555A vörössel, RecQ-d523 pirossal, RecQ-d414 lilával jelölve. A görbét a DNS-kötött RecQ kontrollok alapján normalizáltuk, és két exponenciális függvénnyel illesztettük. A RecQ-d414 konstrukció (mellékpanelben) kiugróan magas fluoreszcenciája arra utal, hogy egyrészt a RecQ-d414 nagy hányada a kiindulási oldatban sem volt DNS-hez kötve, illetve még a reakció mérési holtideje alatt (1 ms) kötődött a DxSO_4 -hoz. **B,** A megfigyelt sebességi állandók (fő panel) és az amplitúdók (mellékpanel) DxSO_4 koncentráció függése (RecQ négyzet, RecQ-Y555A kör, RecQ-d523 álló háromszög, színek, mint **A** ábrán). Az adatokra egyenesek illeszthetők, melyek tengelymetszete kijelöli a fehérjecsapda-mentes értéket. A mérések 5°C -on történtek és a következtetett értékek a **6. táblázatban** találhatóak.

6. táblázat: A RecQ konstrukciók DNS-aktivált ATPáz aktivitása és DNS-kötési tulajdonságai ^a

Paraméterek	Meghatározás módja	RecQ-WT	RecQ-Y555A	RecQ-d523	RecQ-d414
ATPáz k_{cat} (s^{-1}) ^b	PK-LDH assay	32 ± 2	27 ± 1	59 ± 1	52 ± 2
ATPáz $K_{i\text{átszólágo},\text{DNA}}$ (μM) ^{b, c}	PK-LDH assay	$0,068 \pm 0,033$	$0,12 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,03$	19 ± 2
Teljes DNS-indukált fluoreszcencia csökkenés (% a DNS-mentes állapothoz viszonyítva) ^d	Stopped-flow (Amplitúdók)	30 ± 2	20 ± 3	45 ± 4	13 ± 2
A lassú fázis hozzájárulása (a teljes csökkenés %-ban) ^d	Stopped-flow (Amplitúdók)	17 ± 4	0	0	0
k_1 ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ^d	Stopped-flow (Kötési kinetika)	$2,4 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$
k_{-1} (s^{-1}) ^d	Stopped-flow (Kötési kinetika)	29 ± 11	170 ± 40	53 ± 27	280 ± 30
K_1 (μM) ^{d,e}	k_{-1}/k_1	12	100	28	700
	k_{off}/k_1 ^e	1,9	18	1,4	> 1300
	Stopped-flow (Amplitúdók)	49 ± 8	n.d.	54 ± 14	n.d.
$k_{\text{disszociáció}}$ ^{d,f}	Stopped-flow (DxSO ₄)	$4,5 \pm 1.3$	31 ± 3	$2,7 \pm 0.5$	> 500

	chasing)				
DxSO ₄ érzékenység (s ⁻¹ (mg/ml) ⁻¹) ^d	Stopped-flow (DxSO ₄ chasing)	18 ± 3	47 ± 5	0	n.d.
A DNS-kötött mennyiség maximuma (%) ^g	EMSA	100	n.d.	8 ± 1	0
DNS-kötés sztöchiometriája ^f	EMSA	32 ± 10 nt/RecQ	n.d.	110 ± 30 μM ^h	n.d.

^a 5°C, nukleotid-mentes RecQ (0,5 μM) stopped-flow Trp fluoreszcencia adatok (kivéve EMSA). A paraméterek elnevezése az **1. sémára** utal. Minden, a dimenziójában koncentrációt tartalmazó paraméter az nt-ben megadott DNS koncentrációkból adódik. N.d., nem meghatározott.

^b 25°C, 15 nM vad-típusú RecQ vagy 10 nM mutáns RecQ, dT₅₄ jelenlétében.

^c Látszólagos disszociációs állandó steady-state ATPáz aktivitás közben

^d 5°C, RecQ konstrukció (0,5 μM) stopped-flow Trp fluoreszcencia adatok.

^e A mutánsokban, $K_1 = K_{eq}$.

^f $k_{disszociáció}$ az y tengelymetszetből meghatározva.

^g 25°C, 162 nM (nt) izotópjelölt dT₅₄.

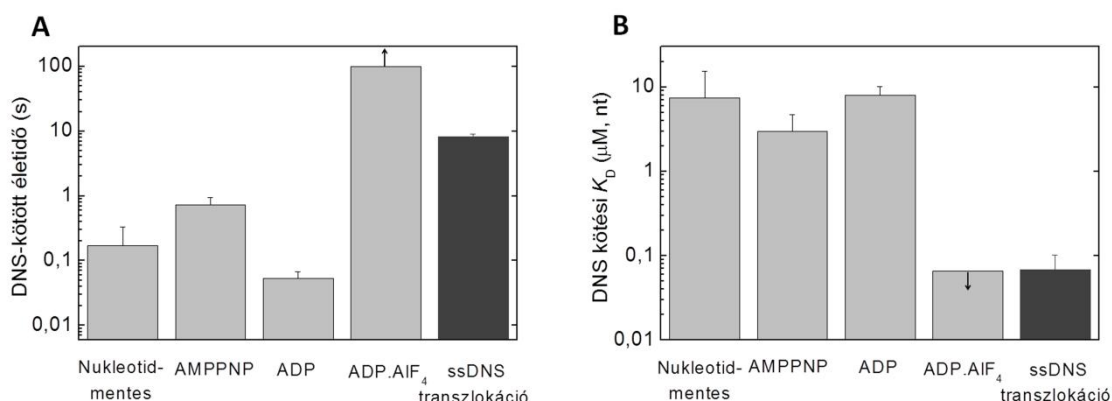
^h Látszólagos K_d érték.

3. konklúzió:

A RecQ helikáznak a DNS-kötést követő, Trp fluoreszcenciával detektált izomerizációs lépése nem detektálható olyan konstrukciókban, amelyekben nem található ssDNS-kötésre képes HRDC domén. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az izomerizáció során megváltozik a HRDC domén ssDNS-kölcsönhatása.

III/4. Nukleotid állapotok az ssDNS transzlokáció során

A RecQ DNS-kötési állandóit különböző nukleotid állapotokban az ssDNS transzlokáció alatt mért értékkel összehasonlítva (**21. ábra**) további értékes információkhoz juthatunk az ssDNS transzlokációról. A közelmúltban többek közt a mi csoportunk által megállapítást nyert, hogy a Ec RecQ helikáz szoros mechanokémiai kapcsoltságú (az egységnyi út megtételéhez szükséges NTP molekulák száma enzimenként közel van az egyhez), közepes processzivitású transzlokációt végez ssDNS sínen (47-49). Jelen munkában bemutatott méréseink szerint pedig a RecQ közepes DNS-kötött életideje rövid (< 1 s) a nukleotid-mentes és ADP-kötött állapotokban, míg rendkívül hosszú (> 100 s) ADP.AIF₄-kötött állapotban. Az ssDNS transzlokációra jellemző közepes DNS-kötött életidő ($8,3 \pm 0,7$ s) (47) pedig az AMPPNP ($0,72 \pm 0,22$ s) és ADP.AIF₄ ($>> 100$ s) állapotokra jellemző értékek közé esik. Ugyanígy a DNS által aktivált ATP hidrolízis látszólagos disszociációs egyensúlyi állandója ($K_{d,app}$) ($0,068 \pm 0,033$ μ M) is az AMPPNP ($3,0 \pm 1,7$ μ M) és ADP.AIF₄ ($>> 0,065$ μ M) állapotoké közt található (**21. ábra**). Így tehát megállapíthatjuk, hogy telítési ATP és DNS koncentrációnál az AMPPNP-kötött és ADP.AIF₄-kötött állapotok által "utánozott" hidrolízis állapotok a legjellemzőbbek. Azaz a mechanokémiai ciklus sebességhatározó lépése vagy az ATP hidrolízis, vagy a foszfát felszabadulás. (Sajnos az ADP.AIF₄ állapot mibenléte nem ismert pontosan.) A RecQ ATPáz ciklus további enzimatikus lépéseinek meghatározása egyrészt a nukleotid állapotok egymásba alakulási sebességi állandóinak (ATP-kötés, hidrolízis, termék felszabadulás) meghatározását, illetve a szoros mechanokémiai csatlakozás pontosabb leírását igényelné.



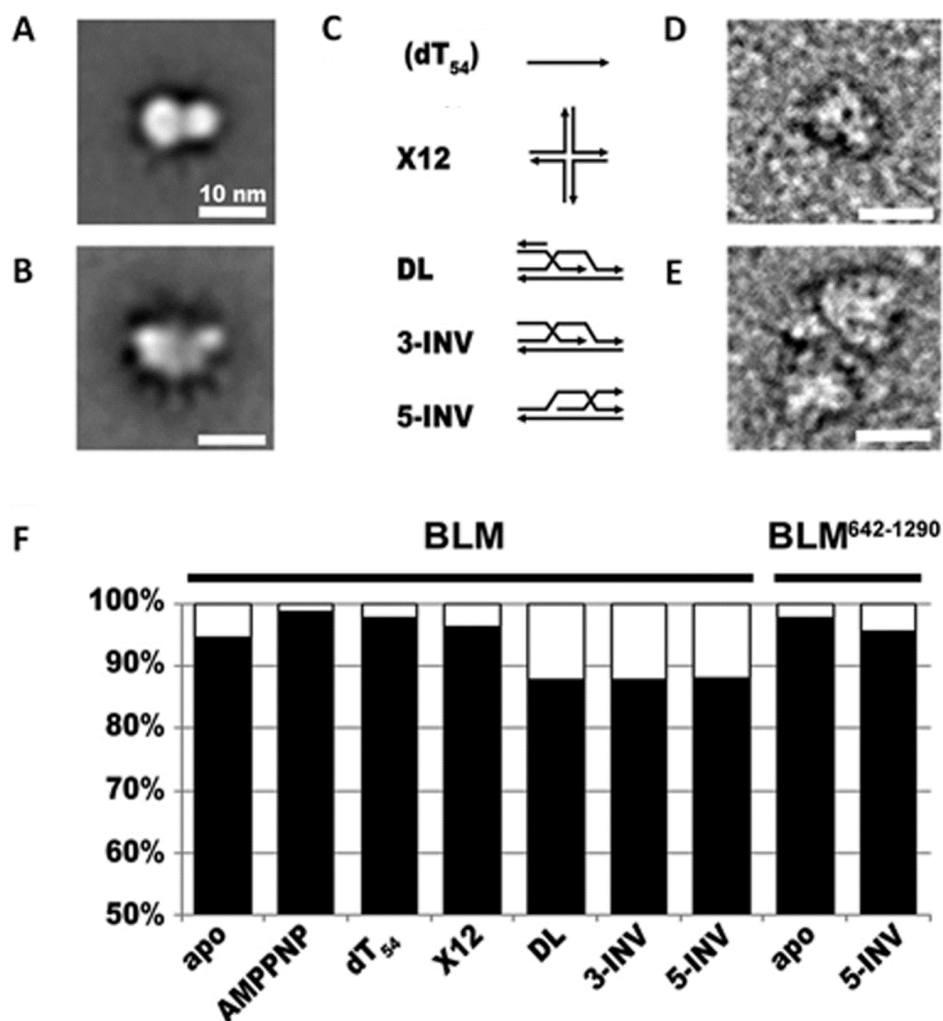
21. ábra: RecQ DNS-kötő állandóinak összehasonlítása különböző nukleotid állapotokban és az ssDNS transzlokáció alatt mért értékkel: **A**, DNS-kötött élettídő a RecQ különböző nukleotid állapotaiban (ebben a munkában meghatározva), összehasonlításban az ATP hidrolízis által hajtott ssDNS transzlokációban azonos fiziológiai körülmények között meghatározott értékkel (47). A RecQ DNS-kötött élettídjét ($\langle \tau \rangle$) az adott nukleotid (N) állapotban a következő módon számoltuk $\langle \tau \rangle = \alpha_1(1/k_{-1}) + \alpha_2(1/k_{-2})$, ahol α_1 és α_2 a megoszlási hányadosai a DNS-kötött enzimsokaság ($\text{RecQ}^+(N)\text{DNS}$ illetve $\text{RecQ}^{++}(N)\text{DNS}$) állapotainak. $\alpha_1 = 1/(K_2+1)$; $\alpha_2 = K_2/(K_2+1)$; lásd **1. táblázat**. **B**, a RecQ különböző nukleotid állapotaiban meghatározott DNS-kötő összesített egyensúlyi állandó (K_{eq}) értékek (**1. táblázat**) összehasonlításban az ATP hidrolízis által hajtott ssDNS transzlokációban azonos fiziológiai körülmények között meghatározott értékkel ($K_{d, \text{látszólagos}}$) (**3. táblázat**). Az ADP.AIF₄ oszlopokon megjelenő nyilak jelzik, hogy csupán a DNS-kötött élettídő (**A**) alsó, és a DNS-kötő K_d (**B**) felső határértéke állapítható meg.

4. konklúzió:

A RecQ helikáz ATPáz ciklusában az AMPPNP-nek megfelelő prehidrolitikus, illetve az ADP.AIF₄-nek megfelelő (véltetően poszthidrolitikus, ADP- és foszfát-kötött) állapot fordul elő legnagyobb steady-state arányokban. Ez arra utal, hogy az ATP hidrolízis, a foszfátfelszabadulás, vagy valamely ezen lépésekhez kapcsolt szerkezeti átalakulás lehet a ciklus sebességhatározó lépése.

III/5. BLM helikáz oligomerizációja

Annak érdekében, hogy a RecQ helikázok egy másik, sokat vitatott DNS-kötő tulajdonságát, a lehetséges oligomerizáció jelenségét vizsgáljuk, csoportunkból Gyimesi Máté vezetésével és részben külső kollaborátorok segítségével komplex vizsgálatokat végeztünk. Ezen mérések olyan módszereket vettek igénybe, mint az elektronmikroszkópos (EM), az atomerő-mikroszkópos (AFM), dinamikus fényszórás (DLS) valamint steady-state és tranziens kinetikai mérések. Én fluoreszcens DNS-esszével járultam hozzá az eredményekhez. Elektronmikroszkópos mérésekkel megállapítottuk, hogy a BLM szubsztrátjai nélkül főleg monomerként, de több konformációs állapotban létezik, ezen az EM műtermékek kiküszöbölése érdekében végzett keresztkötés sem változtat. Nukleotidok és ssDNS jelenlétében tovább csökken az oligomerek aránya. Az *in vivo* szubsztrátot modellező DNS szerkezeteken (D-hurok), nem hidrolizálható ATP analóg jelenlétében kimutatható az oligomerizációs tendencia (főleg dimerek). Ez mutánsokkal igazolt módon a fehérje-fehérje kölcsönhatástól függ. Az AFM mérések megerősíteni látszanak a többnyire monomer formát és konformációs heterogenitást szubsztrát-mentes állapotban. Az 5' behatoló szállal rendelkező D-hurkok esetében, nem-hidrolizálható nukleotid analóg jelenlétében, 44 % oligomer arány jelentkezett, amely főleg dimerként volt azonosítható. Dinamikus fényszórás méréseink következtetései e tendenciát szintén megerősítették. ATPáz méréseket végezve különböző hosszúságú ssDNS-ekkel megállapítottuk, hogy a BLM kötőhelymérete 40 nukleotid körüli, mely azonban nem feltétlenül azonos a direkt érintkezési mérettel. Az általam elvégzett kísérletekben a fluoreszcensen jelölt oligonukleotidok jelváltozását közvetlenül megfigyelve szintén hasonló kötőhely méret adódott. Megállapítottuk továbbá, hogy rövid ssDNS-ek esetében a BLM helikáz és fehérje-fehérje kölcsönható doménjét nélkülöző mutánsa ugyanolyan ATPáz aktivitású, tehát esetleges oligomerek esetén minden alegységnek egyformán kell aktiválnia. Ebben az esetben hosszú ssDNS teljes BLM betöltöttség esetén nem tudná aktiválni az összes alegységet a sztérikus gátlás miatt, amennyiben a BLM gyűrű alakú oligomer formában transzlokál. Méréseink azonban ennek ellenkezőjét mutatták, ami a BLM monomer formában való transzlokációjára utal. A Hill-koefficiens elemzésével megállapítottuk, hogy a BLM egységek vagy nem kommunikálnak az oligomerben, vagy az ATP hidrolíziskor a BLM monomer formában működik.

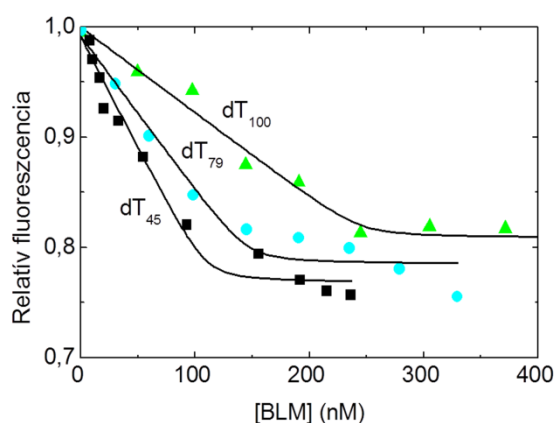


22. ábra: A BLM helikáz elektronmikroszkópos képe és az megjelenési formák eloszlása: **A-B**, A teljes hosszúságú BLM elektronmikroszkópos képeinek átlaga szubsztrát-mentesen, keresztkötéssel (**B**) és anélkül (**A**). **C**, A használt DNS-szubsztrátok sematikus jelölése. **D-E**, Jellemző elektronmikroszkópos kép a BLM monomer állapotáról (**D**) és a keresztkötés utáni dimer állapotáról 2 mM AMPPNP és 10 μ M DL DNS jelenlétében (**E**). **F**, Monomer (fekete) és oligomer (fehér) állapotok közötti megoszlás különböző szubsztrátokkal (10 μ M) 2 mM AMPPNP jelenlétében a teljes hosszúságú és a BLM 1290 esetében. A „scale bar”-ok 10 nm-t jelölnek.

Steady-state fluoreszcencia emissziós titrálásokat végeztem különböző hosszúságú 5'-Cy3 jelölt dT DNS-ekhez (dT_{45} , dT_{79} , dT_{100}) BLM helikázt adagolva (**23. ábra**). A koncentráció függvényében ábrázolt emissziós maximumokra másodfokú függvényt illesztve a következő kötőhely méretek adódtak mol BLM/mol oligo dT egységekben megadva: 1.1 ± 0.1 a dT_{45} , 1.5 ± 0.2 a dT_{79} , és 2.5 ± 0.2 a dT_{100} oligonukleotid ssDNS-ek esetében. Így a DNS hosszok,

melyeket egy BLM molekula elfoglal 41 ± 4 , 54 ± 4 and 41 ± 3 nt-nek adódnak. Fontos, hogy az így kiszámolt kötött DNS méret, nem az aktuálisan elfoglalt nukleotidok száma, hanem inkább az a részlet, ahol egy BLM molekulának a hatása van, amit a működéshez igénybe vesz.

A RecQ helikázzal végzett, az eddigiekben bemutatott kísérletekben szintén nem tapasztaltunk kooperativitásra, oligomerizációra utaló jelet.



23. ábra: BLM helikáz DNS-en elfoglalt mérete: Különböző hosszúságú (dT_{45} fekete négyzet, dT_{79} kék kör, dT_{100} , zöld háromszög) az 3'-végen Cy3 jelölt DNS-ek (100 nM) steady-state fluoreszcencia értékei a BLM koncentráció függvényében. Az értékekre másodfokú függvényt (Adatok elemzése fejezet 2. egyenlet) illesztettünk, mely fekete vonallal látszik.

5. konklúzió:

A BLM helikáz főleg monomerként van jelen DNS-kötött állapotban, azonban a DNS-szerkezetek bonyolultságának növekedésével oligomerizációra (leginkább dimerizációra) való hajlama kis mértékben nő. A BLM helikáz 40 nt hosszúságú DNS-kötőhellyel rendelkezik és monomerként transzlokál az ssDNS-en.

IV. Eredmények értékelése

Munkánk során megállapítottuk, hogy a RecQ helikáz Trp fluoreszcenciája érzékeny DNS hozzáadására. Két fázist sikerült megkülönböztetni a kötési mechanizmusban, melyek egyikét lineáris DNS koncentrációtól való függés jellemzi, míg a második fázis hiperbolikus függést mutat a DNS koncentrációtól. Ebből egy kétfázisú kötési reakcióra következtettünk, melynek kezdő, gyorsabb lépését egy lassabb izomerizáció követi. Korábbi munkákkal összhangban (51) a RecQ DNS-szubsztrátokhoz való kötése átlagos affinitásúnak, mikromólos egyensúlyi állandójúnak adódott. (Megjegyzendő, hogy az általunk megállapított egyensúlyi állandó nukleotid egységben van megadva, az értékek összehasonlításához figyelembe kell venni a kötőhely méretet. Ez az affinitás az 54 nt-nél hosszabb DNS-eknél már nem nőtt (**1. táblázat**). A RecQ helikáz stopped-flow mérések amplitúdójából adódó DNS-kötési sztöchiometriája (14-40 nt/RecQ különböző nukleotid állapotokban, ahogy az **5. táblázatban** látszik) összemérhető az ATPáz aktivitás adatokból meghatározott (10-34 nt/RecQ) méretekkel (47-49,51).

A kinetikai mechanizmust magát a DNS hosszfüggés nem befolyásolta jelentősen (**1. táblázat**), ami arra utal, hogy sem a DNS-végeffektusok, sem a lehetséges több RecQ molekula ugyanarra a DNS-re való kötődése nem befolyásolja a megfigyelt jelenséget. A Trp tranziensek lassú fázisban mért amplitúdójának növekedése a DNS hosszával arra mutat, hogy a K_2 izomerizációs lépés az elfoglalt elsődleges kötési helyen túli ssDNS régiókat is érinthet.

Az első fázis sebességi állandóinál (k_1 , k_{-1}) megfigyeltünk hőmérséklet függést, azonban ez nem érintette az egyensúlyi állandót (K_1). A K_2 konformációváltozás elemei közül egyik sem volt hőmérsékletfüggő (**1, 5. táblázat**).

Az excimer fluoreszcencia mérésekből megállapíthatjuk, hogy a WH doménre és RecA doménre elhelyezett pirén molekulák valóban átlapolnak, ami a Bernstein-féle RecQ szerkezet egy igazolása. Megállapítottuk továbbá, hogy DNS hatására az excimer emissziós jel megszűnik. Ennek kétféle oka lehet, vagy a pirén jel csökken a DNS hatására, vagy megszűnik a pirének átlapolása. A pirének átlapolásának megszűnésére mutat az egyszeresen pirén-jelölt fehérjék érzéketlensége a DNS hozzáadására. Továbbá az excimer jel csökkenésével a monomer pirének jele nő, így nem valószínű, hogy az ok a kioltás lenne. A

pirének átlapolásának megszűnése ugyan történhetne párhuzamos eltávolodással, de a RecQ szerkezet valószínűsíti a domének elfordulását. A kinetikai elemzésből kapott két fázis közül az első, gyorsabb megegyezni látszik a Trp fluoreszcenciából kapott értékekkel. Azonban a következő (de még a fotokióltást megelőző fázis) különbözik az előző mérésekből kapott izomerizációs lépéstől, lassabb annál. Ezeket az adatokat eddig csak konferenciakivonatokban publikáltuk, további mérésekre lesz szükség a pontos DNS koncentráció függés megállapításához. Lehetséges, hogy a megvizsgált számos aktivitás (ATPáz, ATPáz DNS hosszfüggése, szálszétválasztás) egyezősége ellenére a duplán pirén-jelölt 4CRecQ fehérje DNS-kötése DNS fluoreszcenciával követve valamelyest más értékeket adna, mint a vad típusé. Ezért érdemes lehet ennek a konstrukciónak a vad-típusával az azonos Trp fluoreszcencia kísérletben való vizsgálata. Felvethető még a Trp fluoreszcencia és excimer jel párhuzamos detektálása két PMT használatával. Azonban amennyiben mégsem egyezne meg a két izomerizáció elmondható, hogy mivel az excimer jel érzékeny a DNS-re és stopped-flow görbékben mégsem kapjuk vissza a Trp fluoreszcencia mérésakor észlelt izomerizációt, ez a Trp fluoreszcenciával érzékelt izomerizáció nem a domének elfordulásából származik.

Megállapítottuk, hogy a Trp fluoreszcencia csökkenés a RecQ nukleotid állapotára is érzékeny. A nukleotid állapot nukleinsavak kötésére gyakorolt hatását már több fehérjében is megfigyelték, ilyenek a PriA (56), DnaB (57) és Rep (89) helikázok. Az utóbbi két esetben az AMPPNP csökkentette a helikáz ssDNS-hez való affinitását. Henn és munkatársai kimutatták, hogy a kis affinitású ssDNS-kötés az ATP-kötött DEAD-box helikáz, DbpA esetében jelentős növekedést mutat az ATP hidrolízishez kapcsolt konformációváltozás következtében (90). Ez az izomerizáció pedig nélkülözhetetlennek tűnik a dsDNS szálszétválasztásakor. Adataink azt jelzik, hogy a zárt tandem RecA konformáció lehetőséget nyújt a további RecQ doméneknek egy rázáródott, igen erős DNS-kötő szerkezet létrehozására. Ez a zárt állapot képzés analóg lehet az UvrD helikáz DNS-indukált konformáció záródásával (63,64). A RecQ ciklikus DNS-affinitás változása kapcsolt az ún. aromás hurok mozgásával, mely erősen konzervált régió, CxSQWGHDFR szekvenciával. Ez a molekuláriszlet kapcsolja össze az ATP hidrolízist a DNS-kötéssel (52). A közeli DEAD-box régióknak szintén a két szubsztrát kötő régió közti térszerkezet-változás továbbításában, szabályzásában lehet szerepe. Ezt a hepatitis C vírus NS3 helikáz esetében mutációs analízissel bizonyították (91).

A transzlokáció mechanizmusát kétféle kölcsönhatás hajthatja. Ezek közül az egyik a hidrofób aromás hurkok és a nukleinsav bázisok átlapolása, mint ahogy azt az UvrD, Rep,

PcrA helikázoknál kimutatták (64,92,93). Hasonló interakciók szerepet játszhatnak a RecQ helikázok esetében is, a gyenge-erős kötőmód átmenete adódhat az átlapoló kötések megváltoztatásából. Azonban az sem zárható ki, hogy a DNS cukorfoszfát gerincével való másodlagos kötések is segítenek, mint ahogy ez az SF2 helikázoknál gyakori (94-96).

Trp fluoreszcencia stopped-flow kísérleteink megmutatták, hogy a DNS-kötött RecQ izomerizáció (K_2) lépés nem figyelhető meg a teljesen funkcionális HRDC domén nélkül. Ugyanis sem a RecQ-Y555A, sem RecQ-d523, RecQ-d414 mutánsokban nem figyeltünk meg középső fázist, tehát DNS koncentrációtól függő kötési lépés és fotokioltság van, de izomerizáció nincs (**17. ábra 6. Táblázat**). A RecQ-d523 és RecQ-Y555A tartalmazza mind a négy természetes triptofánt, tehát a megfigyelt izomerizáció a HRDC domén DNS-kötéséhez kapcsolódik. Ezen két RecQ mutáns mindemellett megőrizte az erős ssDNS-affinitást, ami arra utal, hogy a HRDC doménnek az egész molekulára vonatkoztatott DNS kölcsönhatásában nincs jelentős szerepe (**6. Táblázat**). Egy korábbi munkában a HRDC domén hiányos RecQ gyengébb kötődést mutatott a 3' túlnyúló véggel rendelkező dsDNS-hez elektroforetikus mobilitási kísérletekben (EMSA), azonban a szálszétválasztási aktivitása nem gyengült (32). Mivel a mi kísérleteinkben a RecQ-d523 fehérje ssDNS-ről való disszociációja csak kis mértékben növekedett meg, erre a jelenségre nem tudunk egyszerű kinetikai magyarázatot adni. A RecQ-d414 mutáns, amelyről mind a HRDC, mind a WH domén hiányzik, minden kísérletben jelentősen csökkent ssDNS-kötési affinitást mutatott, ami arra utal, hogy a WH domén jelentős részét adja a RecQ helikáz teljes ssDNS kölcsönhatásának. Az igen magas telítési ssDNS koncentrációknál mutatott ATPáz aktivitás is ezt erősíti meg, hiszen nem utal arra, hogy a DNS-affinitás csökkenés oka a RecA domének térszerkezet sérülése lenne.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy doktori disszertációmban felsorolt eredmények és adatok arra utalnak, hogy a DNS-kötött RecQ helikázban egy nukleotid állapot függő térszerkezet változás megy végbe. Megfigyeltünk továbbá egy igen erős DNS-kötött állapotot, amely valószínűsíthetőleg az ATP hidrolízis ssDNS transzlokációhoz való mechanokémiai kapcsolásában játszik szerepet. A jellemzett izomerizáció a HRDC domén ssDNS-kötését is magába foglalja, mely nélkül nem detektálható. A korábbi, RecQ helikáz ATPáz aktivitását, ssDNS transzlokációját és dsDNS szálszétválasztási aktivitását érintő munkákkal együtt (47-49,97), elvégzett kutatásunk hozzájárul a RecQ helikáz DNS kötésének pontosabb megismerése által a genomkarbantartás mélyebb megértéséhez.

V. Anyagok és módszerek

Körülmények, anyagok és DNS-ek

Amennyiben a szövegben nincs másképp jelezve, a mérések SF50 pufferben történtek: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂. A mérések egy része 25 °C-on, más része 5 °C-on történt, mely körülményeket kiemeltem a dolgozat során. Az anyagok a Sigma-Aldrich-től származtak (amennyiben mégsem azt megjelöltem). Az ATP-t a Rosche Applied Science-től rendeltük, a γ -P³²-ATP-t az Izotóp Intézet Kft.-től. A RecQ.ADP.AlF₄ komplex 3 μ M RecQ, 1 mM ADP és 1 mM AlCl₃, 5 mM NaF összekeveréséből származott, melyet 3 órán át jégen inkubáltam. A stopped-flow kísérletekben el kellett távolítani a lehetséges ATP szennyezést, ezért mindkét oldali keveréket 20 mU/ml apirázzal kezeltem a mérést megelőzően, fél óráig, szobahőmérsékleten. Az oligonukleotidok és a poly-dT DNS a Sigma-Aldrich-től származott. A csapdaként használt DxSO₄ (Sigma D8906) és heparin 50 mg/ml oldatát desztillált vízbe, majd SF50 pufferbe dializáltuk MW 3500-as dialízis zacskóban (Serva 44183). A DNS koncentrációk a szövegben mindvégig nukleotid koncentrációban (nt) vannak megadva.

Klónozás, fehérjetermelés

Laborunkban rendelkezésre álltak a vad típusú RecQ, RecQ-d523, RecQ-d414, RecQ-Y555A mutánsok DNS-ei. A RecQ4C, a RecQ187 és RecQ487 konstrukciókat QuikChange kit-tel (Stratagene) készítettem el. Minden mutáns szekvenciáját DNS-szekvenálással ellenőriztem.

A DNS konstrukciókat Ec BER2566 (NEB) sejtekbe transzformáltam és a vad RecQ, a RecQ4C, a RecQ187 és RecQ487 konstrukciók esetében a már ismertetett módon (47) indukáltam, expresszáltam és tisztítottam. A RecQ-d523, RecQ-d414, RecQ-Y555A fehérjét a CH oszlop után, heparin oszlop helyett MonoQ (GE Healthcare) anion cserélő oszlopon tisztítottam) (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10 % glycerol, 0-1 M NaCl, 50 perces gradiens, 1 ml/perc.).

Pirén jelölés

A pirén jelölési kísérletek 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ tartalmú pufferben történtek, amennyiben nincs másképp feltüntetve. A pirén-jódacetamidot dimetil-szulfoxidban (10 mM), a pirén-maleimidet dimetil-formamidban (100 mM) oldottuk, jelöléskor a fehérje nagyobb térfogatú mennyiségét adjuk a kis mennyiségű jelölő anyagokhoz, mert így gyorsabban csökken annak koncentrációja, és a fehérje kicsapódása kisebb mértékű. A fehérje oldatot a jelölő pufferbe kétszer dializáltuk az általánosan alkalmazott DTT redukálószer eltávolítása végett, ami szabad szulfhidril csoportjai miatt reagálna a jelölő reaktánsokkal. Nitrogénben gyorsfagyasztott fehérje már nem volt alkalmazható jelölésre, illetve azon fehérjéket melyek nem az utolsó tisztítási lépés után közvetlenül lettek jelölve, 10 mM DTT-vel inkubáltuk (1 órán át) aktiválás céljából a jelölő pufferbe történő dialízis előtt. A jelölés 4 °C-on, folyamatos forgatás mellett ment végbe. Az adalékanyagokat a következő koncentrációkban alkalmaztuk: TCEP 0,1 és 0,5 mM; SDS (1,5 mM) ; GuHCl (0,3 M); UREA (1 M); CHAPS (1 %); Arginin (1 M); spermidin (100 mM); Triton-X (0,2 %); OBG 10 és 50 mM. A fehérjéket jelölés után SF-50 + 10% glicerín pufferbe dializáltuk.

Steady-state ATPáz mérések

Az ATPáz aktivitást kináz/laktát dehidrogenáz (PK-LDH) kapcsolt assayben (14 U/ml PK, 20 U/ml LDH, 1 mM ATP, 1 mM foszfoenol-piruvát, 200 µM NADH, 50 µg/ml BSA mellett SF50 pufferben) mértem. A NADH abszorbanciát ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 6220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 340 nm-en mértem Shimadzu UV-2101PC fotométerrel.

Steady-state fluoreszcencia mérések

A steady-state fluoreszcencia méréseket SPEX Fluoromax spectrofluorométerrel 25 °C-on végeztem, SF50 + 10 % glicerín pufferben. Az excimer méréseket 346 nm-en végeztem (1-nm sávszélességgel) pirén-jódacetamid és 342,5 nm-en pirén-maleimid esetén, 360-500 nm emissziós hullámhosszakon detektálva. A BLM helikáz kötőhely méretére vonatkozó méréseket 545 nm-en való gerjesztéssel, 550-610 nm-es tartományban detektáltam.

Stopped-flow mérések

A disszertációban bemutatott gyorskinetikai méréseket KinTek SF-2004 Stopped-flow szerkezettel végeztem. A Trp fluoreszcenciás mérések esetében 297 nm-en gerjesztettem (4-nm sávszélességgel) és 340-nmes interferencia filtert (Comar) használtam a detektáláshoz. Az excimeres mérésekkor 342,5 nm-en gerjesztettem és 460 IL filtert használtam (Comar).

Elektroforetikus mobilitás változási kísérletek (EMSA)

γ -P³²-ATP és T4 polinukleotid kináz (Fermentas) felhasználásával ³²P- jelölt dT₅₄ oligonukleotidot készítettem és növekvő koncentrációjú RecQ fehérjével kevertem össze és 30 percig, 25 °C-on inkubáltam. A reakció puffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 4 % glycerol volt. Ezután a mintákat 4 %-os TBE gélen elektroforézisnek vettem alá. A géleket Storage Phosphor Screen cassette (GE Healthcare) és Typhoon TRIO+ scanner (Amersham Biosciences) segítségével digitalizáltam.

Adatok elemzése

Az adatok értékelését OriginLab 8.0 (Microcal Corp.) szoftverrel végeztem. Az adatokat a érték \pm SEM formában tüntettem fel a szövegben. A DNS koncentráció függésekre hiperbolikus, vagy másodfokú függvényeket illesztettem (**1. és 2. egyenlet**)

$$y = y_0 + (y_{\text{sat}} - y_0) \frac{c_{\text{DNA}}}{K_d + c_{\text{DNA}}}$$

1. egyenlet

$$y = y_0 + (y_{\text{sat}} - y_0) \frac{c_E + nc_{\text{DNA}} + K_d - \sqrt{(c_E + nc_{\text{DNA}} + K_d)^2 - 4c_E nc_{\text{DNA}}}}{2c_E}$$

2. egyenlet

Ahol y a mért érték az adott DNS koncentráción; y_0 és y_{sat} a nulla, és a telítési DNS koncentrációnál felvett érték; c_E és c_{DNA} a RecQ fehérje és a DNS koncentrációja (nt); n a kötési sztöchiometria reciproka (mol RecQ/mol DNS); és K_d a (látszólagos) disszociáció állandó. A másodfokú függvényt akkor alkalmaztuk, amikor a RecQ és a DNS közti erős kölcsönhatás lehetővé tette a DNS-kötési sztöchiometria meghatározását.

VI. Összefoglalás

A RecQ helikáz fehérjéknek számos aktivitása létezik, melyek a genomkarbantartáshoz, például a homológ-rekombinációs kettős DNS-szálltörés javításához szükségesek, s mely aktivitások alapja a DNS-kötése. A RecQ helikázok konzervált módon tartalmaznak két RecA-domént, melyek az ATP hidrolízisért felelősek, Zn^{2+} -kötő (ZB) domént, winged-helix (WH) domént, és többnyire HRDC domént. Feltételezhetően a RecQ család ezen öt doménjének mindegyike hozzájárul a DNS kötéséhez. Nem ismertek azonban DNS-kötött kristályszerkezetek, pontos DNS-kötőhelyek, illetve a DNS-kötés mechanizmusa.

Munkánk során a vizsgálni kívántuk az *Ec* RecQ helikáz DNS-kötéskor bekövetkező esetleges izomerizációját és annak kapcsolatát a RecQ ATPáz ciklusával és azon keresztül az ssDNS transzlokációval. Fel kívántuk deríteni a DNS-szerkezet oligomerizációra való hatását a BLM helikáz esetében. Szintén célunk volt a RecQ doménjeinek DNS-kötésben játszott szerepének megismerése.

Trp fluoreszcencia jel felhasználásával megállapítottuk, hogy a RecQ DNS- kötése után a fehérje egy izomerizációs lépésen esik át. DNS hosszúságfüggést nem, a DNS-kötési reakció endoterm voltát kimutattuk. Pontmutációk a RecQ molekulába való bevitele után létrehoztunk egy duplán pirén-jelölt RecQ fehérjét.

A pirén excimer jel kialakulásának megfigyelése által megállapíthattuk, hogy a bevitt pirének átlapolnak. Ez az átlapolás megszűnik a ssDNS hatására. Azokban a konstrukciókban, melyekben csak egyszeres pirén jelölés történt, sem excimer jel megjelenését, sem az emissziós spektrum DNS hatására való megváltozását nem lehetett kimutatni. Kinetikai méréseket végezve megfigyeltük, hogy a duplán pirén-jelölt RecQ DNS-kötésének első lépése megegyezik a triptofán fluoreszcenciából megállapítottal, viszont valószínűsíthetően egy új izomerizáció volt megfigyelhető. Mivel a piréneket úgy vittük be a molekulába, hogy a WH domén RecA doménekhez képest végbemenő, Recq1-szerű elfordulása legyen megfigyelhető, valószínűsíthető, hogy a triptofán fluoreszcenciából származó izomerizáció nem ez a változás.

A BLM helikázt főleg monomer formában észleltük, azonban dimerizációs hajlam volt megfigyelhető a DNS-szerkezetek komplexebbé válásával. Megállapítottuk, hogy a BLM helikáz az ssDNS transzlokációt monomer formában végzi, és 40 nt hosszt foglal el a DNS-en.

A Trp fluoreszcenciával megfigyelt konformáció változás ATP hidrolízis állapot függőnek bizonyult, és a DNS-hez legszorosabban kötött állapot az ADP.AIF₄-kötött, vélhetően a poszt-hidrolitikus állapotot utánzó állapot.

RecQ mutánsok felhasználásával megállapítottuk, hogy az izomerizációs lépés működőképes HRDC domén nélkül nem figyelhető meg.

VII. Summary

RecQ helicases exert numerous activities in genome maintenance, mostly related to double-stranded DNA-break repair via homologous recombination. All of these activities are based on DNA-binding. RecQ helicases are multidomain proteins, containing two RecA domains, responsible for ATP hydrolysis, a Zn²⁺-binding (ZB) domain, a winged-helix (WH) domain, and in most cases a HRDC domain. Three of these domains (ZB, WH, HRDC) have been proposed to contribute to DNA-binding. However, DNA-bound crystal structures, precise DNA-binding sites, and the mechanism of DNA-binding are largely unknown.

Our work aimed to investigate the DNA-binding mechanism of RecQ helicases, and the effect of the DNA-binding on their structure.

We observed via tryptophan fluorescence that, after DNA-binding, Ec RecQ helicase undergoes an isomerisation step. The conformational change is ATP hydrolysis state dependent, and the most tightly DNA-bound state was observed in the presence of ADP·AlF₄ (possibly post-hydrolytic) nucleotide analogue. There was no significant DNA length dependence of the DNA-binding, but it appeared to be endothermic. Employing RecQ mutants we showed that without intact HRDC domain the RecQ isomerisation is not detectable.

Introducing point mutations into RecQ helicase we created a double-pyrene labelled RecQ protein. By observing pyrene excimer signals in the emission spectra, we ascertained that the pyrenes are stacked to form excimers. This stacking was abolished by ssDNA binding. The RecQ control construct with a single introduced pyrene showed neither excimer signal, nor a change in the emission spectrum on ssDNA addition. In our kinetic analysis we found that the first DNA-binding phase of double-pyrene labelled RecQ corresponds to one measured by tryptophan fluorescence. On the other hand, the isomerisation appeared different from the one detected via Trp fluorescence. As we introduced the pyrenes to observe the turn of WH domain off-axis of the RecA domains likewise in Recq1, therefore we suggest that the isomerisation in tryptophan fluorescence measurements is a different one.

By steady-state Cy3-labelled DNA fluorescence measurements we calculated the DNA-binding site-size of the BLM helicase to be approximately 40 nt.

VIII. Ábrajegyzék

1. **ábra:** A kétszálú DNS-törés homológ rekombinációs javítása
2. **ábra:** A RecQ helikázok konzervált doménszerkezete
3. **ábra:** A RecQ helikáz DNS-kötése steady-state és gyorskinetikai módszerekkel vizsgálva
4. **ábra:** Stopped-flow készülék és működése
5. **ábra:** A RecQ DNS-kötésének DNS hosszfüggése
6. **ábra:** A RecQ DNS-kötésének hőmérséklet függése
7. **ábra:** A RecQ feltételezett doménmozgásai, és a pirének eltávolodása
8. **ábra:** Ciszteinek és triptofánok a RecQ térszerkezetben
9. **ábra:** A 4CRecQ fehérje pirén jelölése emissziós spektrumokon
10. **ábra:** Egyszeresen pirén-jelölt mutánsok spektrumai
11. **ábra:** ATPáz aktivitás megőrződése
12. **ábra:** Szálszétválasztó aktivitás megőrződése
13. **ábra:** DNS hatása a duplán pirén-jelölt 4CRecQ emissziós spektrumára
14. **ábra:** DNS hatása az egy cisztein bevitelével előállított, jelölt mutánsokra
15. **ábra:** A duplán pirén-jelölt 4CRecQ DNS-kötése
16. **ábra:** A RecQ helikáz DNS-kötése különböző nukleotid állapotokban
17. **ábra:** Különböző RecQ konstrukciók DNS-kötése
18. **ábra:** Különböző RecQ konstrukciók kinetikai jellemzői
19. **ábra:** Különböző RecQ konstrukciók reakciója DNS-el EMSA és ATPáz mérésekben
20. **ábra:** Különböző RecQ konstrukciók DNS-ről való disszociációja
21. **ábra:** RecQ DNS-kötő állandóinak összehasonlítása különböző nukleotid állapotokban és az ssDNS transzlokáció alatt mért értékkel
22. **ábra:** A BLM helikáz elektronmikroszkópos képe és az megjelenési formák eloszlása
23. **ábra:** BLM helikáz DNS-en elfoglalt mérete

IX. Táblázatok jegyzéke

1. **táblázat:** A RecQ kötési tulajdonságok függése a DNS hosszától
2. **táblázat:** Ciszteinek a RecQ molekulában
3. **táblázat:** 4CRecQ fehérje pirén jelölése
4. **táblázat:** A 4CRecQ DNS-kötésének kinetikai állandói
5. **táblázat:** A RecQ helikáz DNS-kötő tulajdonságai különböző nukleotid állapotokban
6. **táblázat:** A RecQ konstrukciók DNS aktivált ATPáz aktivitása és DNS-kötési tulajdonságai

X. Rövidítések

Rövidítés	jelentés
ADP	adenozin-5'-difoszfát
ADP·AlF ₄	adenozin-difoszfát-aluminium-fluorid komplex
AFM	atomerő-mikroszkóp
AlCl ₃	aluminium-klorid
AMPPNP	adenozin 5'-(β,γ-imido)trifoszfát
apo	az enzim szubsztrát-mentes állapota
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATPγS	adenozin 5'-(gamma-tiotrifoszfát)
BLM	Bloom Szindróma helikáz
BSA	marha (bovin) szérum albumin
CMC	kritikus micellaképződési koncentráció
DLS	dinamikus fényszórás
DNS	dezoxi-ribo-nukleinsav
ds	kettős szálú (nukleinsav)
dTn	n-hosszúságú oligo-dezoxi-timidin
DTT	ditiotritol
DxSO ₄	dextrán-szulfát
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EM	elektronmikroszkópia
EMSA	elektroforetikus mobilitás változási kísérletet
HCl	sósav vagy hidrogén-klorid
HR	homológ rekombináció
HRDC	Helikáz/RN-áz D C-terminális Domén
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid

NaCl	nátrium-klorid
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NaF	nátrium-fluorid
NHEJ	nem-homológ végek összekapcsolódása
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PMT	fotoelektron sokszorozó
SDSA	szintézis függő szálpárosítás
ss	egyszálú (nukleinsav)
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
Trp	tritofán
OBG	n-oktil- β -D-glükopiranozid

XI. Értekezés alapjául szolgáló publikációk

Folyóirat cikkek:

Nemzetközi, referált folyóiratban megjelent publikációk:

- Gyimesi M., Pires R. H., Billington N., Sarlós K., **Kocsis Z. S.**, Módos K., Sellers R. J., Kellermayer M. S., Kovács M.
Visualization of Human Bloom's Syndrome Helicase Molecules Bound to Homologous Recombination Intermediates. FASEB Journal 2013; 27(12):4954-64.
- **Kocsis Z. S.**, Sarlós K., Harami G. M., Martina M., Kovács M.
A nucleotide- and HRDC-domain-dependent structural transition in DNA-bound RecQ helicase. Journal of Biological Chemistry, 2014, e-pub 2014 Jan 8, in press (MS ID: JBC/2013/530741)

Konferencia előadások:

- 2013, Hungarian Molecular Life Sciences 2013 Conference, Siófok, Hungary:
Kocsis Z. S., Sarlós K., Kovács M., Harami G. M., Gyimesi M., Martina M., Seol Y., Ferencziová V., Neuman K. C.
Domain Movements and Sequence-specific Pausing of RecQ Helicases.
- 2013, The Student Scientific Conference on Biotechnology and Biomedicine, Brno, Czech Republic:
Kocsis Z. S., Sarlós K., Kovács M., Harami G. M., Gyimesi M., Martina M., Seol Y., Ferencziová V., Neuman K. C.
Domain Movements and Sequence-specific Pausing of RecQ Helicases.

XII. Egyéb publikációk

Folyóirat cikkek:

Nemzetközi, referált folyóiratban megjelent publikációk:

- **Kocsis Z. S.**, Molnár C. S., Watanabe M., Daneels G., Moechars D., Liposits Z., Hrabovszky E. Demonstration of vesicular glutamate transporter-1 in corticotroph cells in the anterior pituitary of the rat. *Neurochem Int* 2009; 56:479-486.

Magyar cikkek:

- **Kocsis Z. S.**, Haracska L., Szüts D., Kovács M.
DNS-hibajavítás a megkettőződés során. *Természettudományi közlöny, Természet Világa folyóirat* 2013,144. évf 6. füzet
- **Kocsis Z. S.**
Helikáz-gátlók terápia felhasználása. *mRNS.hu*, 2013.10.15.
- **Kocsis Z. S.**
Új tudományos megközelítés a rák gyógyításban. *Daganatok.hu*, 2013.12.05.

Konferencia absztraktok:

- 2008, Meeting of Hungarian Neuroscience Society, Debrecen, Hungary:
Kocsis Z. S.; Deli L.; Kalló I.; Horváth C. M.; Keller É.; Liposits Z.; Hrabovszky E.
Localisation of synaptic vesicle protein-2 in rat and human hypophysis.
- 2009, Meeting of Hungarian Neuroscience Society, Budapest, Hungary:
Kocsis Z. S.; Kalló I.; Wittmann G.; Fekete C.; Liposits Z.; Hrabovszky E.
Occurrence and phenotype of glutamatergic elements in the adenohypophysis of the rat.
- 2011, FASEB Summer Research Conference, Steamboat Springs, USA:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Mechanistic basis of the DNA-restructuring activity of the Rad5 double-stranded DNA translocase.

- 2011, Annual Meeting of Hungarian Biochemical Society, Pécs, Hungary:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Mechanistic basis of the DNA-restructuring activity of the Rad5 double-stranded DNA translocase.
- 2012, Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego, USA:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Mechanochemistry of the Rad5 double-stranded DNA translocase.
- 2012, FEBS3+ Meeting, Opatija, Croatia:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Fork reversal by Rad5: Molecular basis.
- 2012, IUBMP&FEBS YSP, Cadiz, Spain:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Molecular mechanism of the fork reversal by Rad5.
- 2012, IUBMP&FEBS, Sevilla, Spain:
Kocsis Z. S., Pintér L., Haracska L., Kovács M.
Molecular mechanism of the fork reversal by Rad5.

XIII. Irodalomjegyzék

1. Kawasaki, K., Maruyama, S., Nakayama, M., Matsumoto, K., and Shibata, T. (2002) *Drosophila melanogaster* RECQ5/QE DNA helicase: stimulation by GTP binding. *Nucleic Acids Res* **30**, 3682-3691
2. Ozsoy, A. Z., Sekelsky, J. J., and Matson, S. W. (2001) Biochemical characterization of the small isoform of *Drosophila melanogaster* RECQ5 helicase. *Nucleic Acids Res* **29**, 2986-2993
3. Lohman, T. M., and Bjornson, K. P. (1996) Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem* **65**, 169-214
4. Linder, P., and Fuller-Pace, F. V. (2013) Looking back on the birth of DEAD-box RNA helicases. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 750-755
5. Wu, Y. (2012) Unwinding and rewinding: double faces of helicase? *J Nucleic Acids* **2012**, 140601
6. Kamath-Loeb, A., Loeb, L. A., and Fry, M. (2012) The Werner syndrome protein is distinguished from the Bloom syndrome protein by its capacity to tightly bind diverse DNA structures. *PLoS One* **7**, e30189
7. Singh, D. K., Ahn, B., and Bohr, V. A. (2009) Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging. *Biogerontology* **10**, 235-252
8. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70
9. Krokan, H. E., and Bjoras, M. (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012583
10. Kisker, C., Kuper, J., and Van Houten, B. (2013) Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012591
11. Jiricny, J. (2013) Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012633
12. Kakarougkas, A., and Jeggo, P. A. (2014) DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol*
13. Thompson, L. H., and Schild, D. (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* **509**, 49-78

14. Nimonkar, A. V., Ozsoy, A. Z., Genschel, J., Modrich, P., and Kowalczykowski, S. C. (2008) Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16906-16911
15. Schwendener, S., Raynard, S., Paliwal, S., Cheng, A., Kanagaraj, R., Shevelev, I., Stark, J. M., Sung, P., and Janscak, P. (2010) Physical interaction of RECQ5 helicase with RAD51 facilitates its anti-recombinase activity. *J Biol Chem* **285**, 15739-15745
16. Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E. H., and Mazin, A. V. (2007) Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev* **21**, 3085-3094
17. Bachrati, C. Z., and Hickson, I. D. (2008) RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma* **117**, 219-233
18. Plank, J. L., Wu, J., and Hsieh, T. S. (2006) Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11118-11123
19. Wu, L., and Hickson, I. D. (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**, 870-874
20. Decottignies, A. (2013) Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. *Front Genet* **4**, 48
21. Khakhar, R. R., Cobb, J. A., Bjergbaek, L., Hickson, I. D., and Gasser, S. M. (2003) RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance. *Trends Cell Biol* **13**, 493-501
22. Oh, S. D., Lao, J. P., Hwang, P. Y., Taylor, A. F., Smith, G. R., and Hunter, N. (2007) BLM ortholog, Sgs1, prevents aberrant crossing-over by suppressing formation of multichromatid joint molecules. *Cell* **130**, 259-272
23. Singleton, M. R., Dillingham, M. S., and Wigley, D. B. (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* **76**, 23-50
24. Bohr, V. A. (2008) Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem Sci* **33**, 609-620
25. Wu, L., and Hickson, I. D. (2006) DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks. *Annu Rev Genet* **40**, 279-306
26. Harrigan, J. A., and Bohr, V. A. (2003) Human diseases deficient in RecQ helicases. *Biochimie* **85**, 1185-1193

27. Harmon, F. G., and Kowalczykowski, S. C. (1998) RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Genes Dev* **12**, 1134-1144
28. Hanada, K., Ukita, T., Kohno, Y., Saito, K., Kato, J., and Ikeda, H. (1997) RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3860-3865
29. Handa, N., Morimatsu, K., Lovett, S. T., and Kowalczykowski, S. C. (2009) Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of E. coli. *Genes Dev* **23**, 1234-1245
30. Courcelle, J., and Hanawalt, P. C. (1999) RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **262**, 543-551
31. Harami, G. M., Gyimesi, M., and Kovacs, M. (2013) From keys to bulldozers: expanding roles for winged helix domains in nucleic-acid-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **38**, 364-371
32. Bernstein, D. A., and Keck, J. L. (2005) Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain. *Structure* **13**, 1173-1182
33. Bernstein, D. A., Zittel, M. C., and Keck, J. L. (2003) High-resolution structure of the E.coli RecQ helicase catalytic core. *EMBO J* **22**, 4910-4921
34. Huang, S., Li, B., Gray, M. D., Oshima, J., Mian, I. S., and Campisi, J. (1998) The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nat Genet* **20**, 114-116
35. Opresko, P. L., Laine, J. P., Brosh, R. M., Jr., Seidman, M. M., and Bohr, V. A. (2001) Coordinate action of the helicase and 3' to 5' exonuclease of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* **276**, 44677-44687
36. Perry, J. J., Yannone, S. M., Holden, L. G., Hitomi, C., Asaithamby, A., Han, S., Cooper, P. K., Chen, D. J., and Tainer, J. A. (2006) WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 414-422
37. Liu, J. L., Rigolet, P., Dou, S. X., Wang, P. Y., and Xi, X. G. (2004) The zinc finger motif of Escherichia coli RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J Biol Chem* **279**, 42794-42802

38. von Kobbe, C., Thoma, N. H., Czyzewski, B. K., Pavletich, N. P., and Bohr, V. A. (2003) Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains. *J Biol Chem* **278**, 52997-53006
39. Kitano, K., Kim, S. Y., and Hakoshima, T. (2010) Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure* **18**, 177-187
40. Hu, J. S., Feng, H., Zeng, W., Lin, G. X., and Xi, X. G. (2005) Solution structure of a multifunctional DNA- and protein-binding motif of human Werner syndrome protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18379-18384
41. Kitano, K., Yoshihara, N., and Hakoshima, T. (2007) Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN. *J Biol Chem* **282**, 2717-2728
42. Sato, A., Mishima, M., Nagai, A., Kim, S. Y., Ito, Y., Hakoshima, T., Jee, J. G., and Kitano, K. (2010) Solution structure of the HRDC domain of human Bloom syndrome protein BLM. *J Biochem* **148**, 517-525
43. Liu, S., Zhang, W., Gao, Z., Ming, Q., Hou, H., Lan, W., Wu, H., Cao, C., and Dong, Y. (2013) NMR structure of the N-terminal-most HRDC1 domain of RecQ helicase from *Deinococcus radiodurans*. *FEBS Lett* **587**, 2635-2642
44. Wu, L., Chan, K. L., Ralf, C., Bernstein, D. A., Garcia, P. L., Bohr, V. A., Vindigni, A., Janscak, P., Keck, J. L., and Hickson, I. D. (2005) The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions. *EMBO J* **24**, 2679-2687
45. Pike, A. C., Shrestha, B., Popuri, V., Burgess-Brown, N., Muzzolini, L., Costantini, S., Vindigni, A., and Gileadi, O. (2009) Structure of the human RECQ1 helicase reveals a putative strand-separation pin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1039-1044
46. Lucic, B., Zhang, Y., King, O., Mendoza-Maldonado, R., Berti, M., Niesen, F. H., Burgess-Brown, N. A., Pike, A. C., Cooper, C. D., Gileadi, O., and Vindigni, A. (2011) A prominent beta-hairpin structure in the winged-helix domain of RECQ1 is required for DNA unwinding and oligomer formation. *Nucleic Acids Res* **39**, 1703-1717
47. Sarlos, K., Gyimesi, M., and Kovacs, M. (2012) RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 9804-9809
48. Rad, B., and Kowalczykowski, S. C. (2012) Efficient coupling of ATP hydrolysis to translocation by RecQ helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1443-1448

49. Rad, B., and Kowalczykowski, S. C. (2012) Translocation of *E. coli* RecQ helicase on single-stranded DNA. *Biochemistry* **51**, 2921-2929
50. Gyimesi, M., Harami, G. M., Sarlos, K., Hazai, E., Bikadi, Z., and Kovacs, M. (2012) Complex activities of the human Bloom's syndrome helicase are encoded in a core region comprising the RecA and Zn-binding domains. *Nucleic Acids Res* **40**, 3952-3963
51. Dou, S. X., Wang, P. Y., Xu, H. Q., and Xi, X. G. (2004) The DNA binding properties of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J Biol Chem* **279**, 6354-6363
52. Zittel, M. C., and Keck, J. L. (2005) Coupling DNA-binding and ATP hydrolysis in *Escherichia coli* RecQ: role of a highly conserved aromatic-rich sequence. *Nucleic Acids Res* **33**, 6982-6991
53. Ren, H., Dou, S. X., Rigolet, P., Yang, Y., Wang, P. Y., Amor-Gueret, M., and Xi, X. G. (2007) The arginine finger of the Bloom syndrome protein: its structural organization and its role in energy coupling. *Nucleic Acids Res* **35**, 6029-6041
54. Pandey, N., Govardhan, S., and Pathak, R. K. (2011) Mobility in the structure of *E. coli* recQ helicase upon substrate binding as seen from molecular dynamics simulations. *Bioinformation* **7**, 371-374
55. Chao, K., and Lohman, T. M. (1990) DNA and nucleotide-induced conformational changes in the *Escherichia coli* Rep and helicase II (UvrD) proteins. *J Biol Chem* **265**, 1067-1076
56. Lucius, A. L., Jezewska, M. J., and Bujalowski, W. (2006) Allosteric interactions between the nucleotide-binding sites and the ssDNA-binding site in the PriA helicase-ssDNA complex. 3. *Biochemistry* **45**, 7237-7255
57. Jezewska, M. J., and Bujalowski, W. (1996) Global conformational transitions in *Escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein induced by ATP, ADP, and single-stranded DNA binding. Multiple conformational states of the helicase hexamer. *J Biol Chem* **271**, 4261-4265
58. Jezewska, M. J., Kim, U. S., and Bujalowski, W. (1996) Binding of *Escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein to single-stranded DNA. Long-range allosteric conformational changes within the protein hexamer. *Biochemistry* **35**, 2129-2145
59. Galletto, R., Jezewska, M. J., and Bujalowski, W. (2004) Multistep sequential mechanism of *Escherichia coli* helicase PriA protein-ssDNA interactions. Kinetics and

- energetics of the active ssDNA-searching site of the enzyme. *Biochemistry* **43**, 11002-11016
60. Bujalowski, W., and Jezewska, M. J. (2000) Kinetic mechanism of the single-stranded DNA recognition by Escherichia coli replicative helicase DnaB protein. Application of the matrix projection operator technique to analyze stopped-flow kinetics. *J Mol Biol* **295**, 831-852
 61. Soultanas, P., Dillingham, M. S., Velankar, S. S., and Wigley, D. B. (1999) DNA binding mediates conformational changes and metal ion coordination in the active site of PcrA helicase. *J Mol Biol* **290**, 137-148
 62. Toseland, C. P., and Webb, M. R. (2013) ATPase Mechanism of the 5'-3' DNA Helicase, RecD2: EVIDENCE FOR A PRE-HYDROLYSIS CONFORMATION CHANGE. *J Biol Chem* **288**, 25183-25193
 63. Jia, H., Korolev, S., Niedziela-Majka, A., Maluf, N. K., Gauss, G. H., Myong, S., Ha, T., Waksman, G., and Lohman, T. M. (2011) Rotations of the 2B sub-domain of E. coli UvrD helicase/translocase coupled to nucleotide and DNA binding. *J Mol Biol* **411**, 633-648
 64. Lee, J. Y., and Yang, W. (2006) UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke. *Cell* **127**, 1349-1360
 65. Gyimesi, M., Sarlos, K., and Kovacs, M. (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* **38**, 4404-4414
 66. Janscak, P., Garcia, P. L., Hamburger, F., Makuta, Y., Shiraishi, K., Imai, Y., Ikeda, H., and Bickle, T. A. (2003) Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the bloom syndrome protein. *J Mol Biol* **330**, 29-42
 67. Karow, J. K., Newman, R. H., Freemont, P. S., and Hickson, I. D. (1999) Oligomeric ring structure of the Bloom's syndrome helicase. *Curr Biol* **9**, 597-600
 68. Mazina, O. M., Rossi, M. J., Deakyne, J. S., Huang, F., and Mazin, A. V. (2012) Polarity and bypass of DNA heterology during branch migration of Holliday junctions by human RAD54, BLM, and RECQ1 proteins. *J Biol Chem* **287**, 11820-11832
 69. Xu, Y. N., Bazeille, N., Ding, X. Y., Lu, X. M., Wang, P. Y., Bugnard, E., Grondin, V., Dou, S. X., and Xi, X. G. (2012) Multimeric BLM is dissociated upon ATP hydrolysis and functions as monomers in resolving DNA structures. *Nucleic Acids Res* **40**, 9802-9814

70. Beresten, S. F., Stan, R., van Brabant, A. J., Ye, T., Naureckiene, S., and Ellis, N. A. (1999) Purification of overexpressed hexahistidine-tagged BLM N431 as oligomeric complexes. *Protein Expr Purif* **17**, 239-248
71. Compton, S. A., Tolun, G., Kamath-Loeb, A. S., Loeb, L. A., and Griffith, J. D. (2008) The Werner syndrome protein binds replication fork and holliday junction DNAs as an oligomer. *J Biol Chem* **283**, 24478-24483
72. Muzzolini, L., Beuron, F., Patwardhan, A., Popuri, V., Cui, S., Niccolini, B., Rappas, M., Freemont, P. S., and Vindigni, A. (2007) Different quaternary structures of human RECQ1 are associated with its dual enzymatic activity. *PLoS Biol* **5**, e20
73. Vindigni, A., and Hickson, I. D. (2009) RecQ helicases: multiple structures for multiple functions? *HFSP J* **3**, 153-164
74. Xu, H. Q., Deprez, E., Zhang, A. H., Tauc, P., Ladjimi, M. M., Brochon, J. C., Auclair, C., and Xi, X. G. (2003) The Escherichia coli RecQ helicase functions as a monomer. *J Biol Chem* **278**, 34925-34933
75. Zhang, X. D., Dou, S. X., Xie, P., Hu, J. S., Wang, P. Y., and Xi, X. G. (2006) Escherichia coli RecQ is a rapid, efficient, and monomeric helicase. *J Biol Chem* **281**, 12655-12663
76. Li, N., Henry, E., Guiot, E., Rigolet, P., Brochon, J. C., Xi, X. G., and Deprez, E. (2010) Multiple Escherichia coli RecQ helicase monomers cooperate to unwind long DNA substrates: a fluorescence cross-correlation spectroscopy study. *J Biol Chem* **285**, 6922-6936
77. Harmon, F. G., and Kowalczykowski, S. C. (2001) Biochemical characterization of the DNA helicase activity of the escherichia coli RecQ helicase. *J Biol Chem* **276**, 232-243
78. Lohman, T. M., and Kowalczykowski, S. C. (1981) Kinetics and mechanism of the association of the bacteriophage T4 gene 32 (helix destabilizing) protein with single-stranded nucleic acids. Evidence for protein translocation. *J Mol Biol* **152**, 67-109
79. Kozlov, A. G., and Lohman, T. M. (2002) Stopped-flow studies of the kinetics of single-stranded DNA binding and wrapping around the Escherichia coli SSB tetramer. *Biochemistry* **41**, 6032-6044
80. Stole, E., and Bryant, F. R. (1997) The rate-determining step on the recA protein-catalyzed ssDNA-dependent ATP hydrolysis reaction pathway. *Biochemistry* **36**, 3483-3490

81. Flowers, S., Biswas, E. E., and Biswas, S. B. (2003) Conformational dynamics of DnaB helicase upon DNA and nucleotide binding: analysis by intrinsic tryptophan fluorescence quenching. *Biochemistry* **42**, 1910-1921
82. Bjornson, K. P., Moore, K. J., and Lohman, T. M. (1996) Kinetic mechanism of DNA binding and DNA-induced dimerization of the Escherichia coli Rep helicase. *Biochemistry* **35**, 2268-2282
83. Bjornson, K. P., Hsieh, J., Amaratunga, M., and Lohman, T. M. (1998) Kinetic mechanism for the sequential binding of two single-stranded oligodeoxynucleotides to the Escherichia coli Rep helicase dimer. *Biochemistry* **37**, 891-899
84. <http://chemwiki.ucdavis.edu>
85. Conibear, P. B., Bagshaw, C. R., Fajer, P. G., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol* **10**, 831-835
86. Lehrer, S. S. (1995) Pyrene excimer fluorescence as a probe of protein conformational change. *Subcell Biochem* **24**, 115-132
87. Kowalczykowski, S. C., and Krupp, R. A. (1995) DNA-strand exchange promoted by RecA protein in the absence of ATP: implications for the mechanism of energy transduction in protein-promoted nucleic acid transactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3478-3482
88. Geeves, M. A., and Holmes, K. C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* **68**, 687-728
89. Wong, I., and Lohman, T. M. (1992) Allosteric effects of nucleotide cofactors on Escherichia coli Rep helicase-DNA binding. *Science* **256**, 350-355
90. Henn, A., Cao, W., Hackney, D. D., and De La Cruz, E. M. (2008) The ATPase cycle mechanism of the DEAD-box rRNA helicase, DbpA. *J Mol Biol* **377**, 193-205
91. Heilek, G. M., and Peterson, M. G. (1997) A point mutation abolishes the helicase but not the nucleoside triphosphatase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *J Virol* **71**, 6264-6266
92. Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G. H., Lohman, T. M., and Waksman, G. (1997) Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell* **90**, 635-647

93. Velankar, S. S., Soultanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S., and Wigley, D. B. (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* **97**, 75-84
94. Kim, D. W., Kim, J., Gwack, Y., Han, J. H., and Choe, J. (1997) Mutational analysis of the hepatitis C virus RNA helicase. *J Virol* **71**, 9400-9409
95. Buttner, K., Nehring, S., and Hopfner, K. P. (2007) Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 647-652
96. Pyle, A. M. (2008) Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. *Annu Rev Biophys* **37**, 317-336
97. Pan, B. Y., Dou, S. X., Yang, Y., Xu, Y. N., Bugnard, E., Ding, X. Y., Zhang, L., Wang, P. Y., Li, M., and Xi, X. G. (2010) Mutual inhibition of RecQ molecules in DNA unwinding. *J Biol Chem* **285**, 15884-15893

XIV. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Kovács Mihálynak, hogy lehetőséget adott a helikázok csodálatos világának megismerésére. Köszönöm Harami Gábornak, Dr. Sarlós Katának, és Dr. Gyimesi Máténak, hogy együtt dolgozhattunk a RecQ helikázok témakörén. Köszönöm Ferenczova Veronikának, Krajcsi Anikónak, Nagy Nikolettnek, és Fall Viktóriának a laborbéli légkör megteremtését. Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet a Stoci- és Málna-laborok minden tagjának, amiért segítettek munkámat. Hálás vagyok Professzor Gráf Lászlónak és Professzor Nyitray Lászlónak, hogy lehetővé tették számomra a tanszéken való munkát. Köszönöm a Biokémiai Tanszék tagjainak a remek együtt töltött időt.

Köszönöm a lehetőséget, amit a Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj elnyerésével kaptam a doktori munkám befejezéséhez. (A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.)

Köszönöm a türelmet a családomnak, és a támogatást anyukámnak, Siklós Júliának, aki lehetővé tette, hogy eljussak a doktori iskoláig. Köszönöm a támogatást barátaimnak, akik mindig együtt tudtak velem érezni.